

Aus dem Institut für Gerichtliche Medizin
und Kriminalistik der Universität Erlangen
Direktor: Professor Dr. Dr. E. Weinig

Untersuchungen über die Gelbfärbung
des p-Nitrophenol-Natriums in Gegenwart von Glukose

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Friedrich-Alexander-Universität
zu
Erlangen

Vorgelegt von
Renate Prechtel
aus Nürnberg

Aus dem Institut für Gerichtliche Medizin
und Kriminalistik der Universität Erlangen
Direktor: Professor Dr. Dr. E. Weinig

Untersuchungen über die Gelbfärbung
des p-Nitrophenol-Natriums in Gegenwart von Glukose

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Friedrich-Alexander-Universität
zu
Erlangen

Vorgelegt von
Renate Prechtel
aus Nürnberg



Gedruckt mit Erlaubnis der
Medizinischen Fakultät der
Universität Erlangen

Referent: Professor Dr. med. et phil. E. Weinig

Dekan: Professor Dr. med. N. Henning

Tag der mündlichen Prüfung: 27./28. Juni 1958

I N H A L T

Seite

EINLEITUNG

Zum Nachweis von E 605 im Blut	1
A. Die Gelbfärbung des p-Nitrophenol-Natriums	7
Die Wirkung von Wasserstoff-Superoxyd	9
B. Die Gelbfärbung in alkalischen Glukoselösungen	11
I. Chemische Vorgänge in alkalischen Glukoselösungen	11
Reduktone und Reduktonate	11
a) Reaktionsablauf in Abwesenheit von Oxydations- mitteln	14
1) Mutarotation	14
2) Isomerisierungen	15
3) Molekülzerfall	15
4) Reduktonbildung	16
5) Säurebildung	17
6) Polymerisation	18
7) Reaktionsende	18
Das Verhalten des Reduktionsvermögens	18
b) Reaktionsablauf in Gegenwart von Oxydations- mitteln	19
c) Die Abhängigkeit des Reaktionsablaufes von an- deren Faktoren	20
1) Alkalimenge	21
2) Glukosemenge	23
3) Art der Kationen	24
Ammoniak	25
4) Anionen	26
5) Temperatur	28
6) Versuchsdauer	29
7) Bestrahlung	29
d) Die Einwirkung alkalischer Glukoselösungen auf aromatische Nitrokörper	29
1) Reduktion der Nitrogruppe	30
α) Colorimetrische Bestimmung der Glukose	31
β) Technische Darstellung einzelner Re- duktionsprodukte	34
2) Sekundäre Reaktionen	34
II. Gefärbte Substanzen, die bei alkalischer Reaktion aus Glukose entstehen	37
a) Der Einfluß der Reaktionsbedingungen auf die Farbstoffbildung	38

1) Wasserstoffionen-Konzentration	38
Farbstoffe, die bei neutraler oder saurer Reaktion aus Glukose und Fructose in der Hitze entstehen	39
2) Temperatur	39
3) Reaktionszeit	40
4) Glukosekonzentration	41
5) Oxydationsmittel	43
6) Andere Möglichkeiten, die Farbstoffbildung zu unterdrücken	45
b) Die Entstehung der Farbstoffe	46
Gefärbte Substanzen in Lösungen von	
1) Glyzerinaldehyd und Dioxyaceton	46
2) Methylglyoxal	47
3) Acetol	47
4) Triose-Redukton	47
Die Entwicklung der UV-Absorption in schwach alkalischen Lösungen von Glukose	48
Die UV-Absorption der Lösungen von	
1) Glyzerinaldehyd	49
2) Dioxyaceton	49
3) Methylglyoxal	49
4) Acetol	49
5) Triose-Redukton und Hydroxybrenztrauben- aldehyd	50
6) Anderen Zuckerabbauprodukten	50
Vergleich	50
Die UV-Absorption in Lösungen von Glukose und Fructose nach dem Erhitzen bei saurer oder neutraler Reaktion	51
Chemische Vorgänge bei der Farbstoffbildung	51
c) Die chemische Struktur der Farbstoffe	53
d) Die physikalischen Eigenschaften der Farbstoffe	54
1) Löslichkeit	54
2) Isolierung bzw. Eliminierung	55
3) Aussehen	58
4) UV-Absorption	60
C. Die Gelbfärbung in mit Natronlauge gekochten Glukose- lösungen bei Zusatz von p-Nitrophenol (Eigene Unter- suchungen)	61
I. Die Gelbfärbung in Gemischen von p-Nitrophenol und mit Natronlauge gekochten Glukoselösungen	61
a) Bei schwach alkalischer Reaktion	61
b) Bei stark alkalischer Reaktion	62

II. Die Gelbfärbung in alkalischen Glukoselösungen, denen vor dem Kochen p-Nitrophenol zugesetzt wurde	63
a) Bei schwach alkalischer Reaktion	63
b) Bei stark alkalischer Reaktion	64
III. Die Gelbfärbung bei der alkalischen Verseifung von E 605-Wirkstoff in Gegenwart von Glukose	66
a) In Abwesenheit von Oxydationsmitteln	66
1) Bei gewöhnlicher Temperatur	66
2) Beim Erwärmen	66
b) In Anwesenheit von Wasserstoff-Superoxyd	67
1) Bei gewöhnlicher Temperatur	67
2) Beim Erwärmen	67
ZUSAMMENFASSUNG	69
LITERATUR	72

E I N L E I T U N G

Zum Nachweis von E 605 im Blut

Zur Erkennung von Vergiftungen mit dem Schädlingsbekämpfungsmittel E 605 (Parathion) wurde 1952 von SCHWERD u. SCHMIDT eine einfache Vorprobe im Blut angegeben. Die Reaktion hat vor zahlreichen anderen, meist zeitraubenden Nachweismethoden (Literatur bei Gg. SCHMIDT; POST; PRIBILLA; FEIERTAG; BERG u. MAIER) den Vorzug der raschen Durchführbarkeit und war deshalb für die Klinik besonders geeignet. Sie beruht auf dem Auftreten einer Gelbfärbung beim Aufkochen des alkalisierten Trichloressigsäurefiltrates des Blutes. Der Probe liegt der Gedanke zugrunde, daß das im E 605 enthaltene, wirksame Diaethyl-p-Nitrophenyl-Thiophosphat durch kurzes Aufkochen mit Natronlauge gespalten wird, wobei u.a. das intensiv gelb gefärbte Natriumsalz des p-Nitrophenols entstehen soll.

Die Bildung von p-Nitrophenolat beim Verseifen von reinen Lösungen des E 605-Wirkstoffes mit Alkali wurde durch KETELAAR u. HELLINGMAN nachgewiesen und kolorimetrisch verfolgt; MÜHLMANN u. SCHRADER prüften die Abhängigkeit der Hydrolyse in p-Nitrophenol und Diaethyl-Thiophosphorsäure von der Temperatur und der Wasserstoffionen-Konzentration; vergl. auch FEIERTAG. Einen weiteren Beweis erbrachte die Untersuchung der spektralen Absorptionskurven im UV-Bereich (POST). Die des p-Nitrophenols sind für das saure und das alkalische Gebiet verschieden und so charakteristisch, daß sie, zusammen mit der vor der Alkalikochprobe gemessenen, pH-unabhängigen Kurve des ungespaltenen Esters, zum spezifischen Nachweis von E 605 dienen können (Abb. 1). Voraussetzung hierfür ist allerdings eine weitgehend gereinigte Lösung, wie sie z.B. das Wasserdampf-Destillat von Mageninhalt darstellen kann (Gg. SCHMIDT; POST; BURGER). In einer solchen liefert auch die Alkalikochprobe den erwarteten grünlichgelben Farbton.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548806_0051

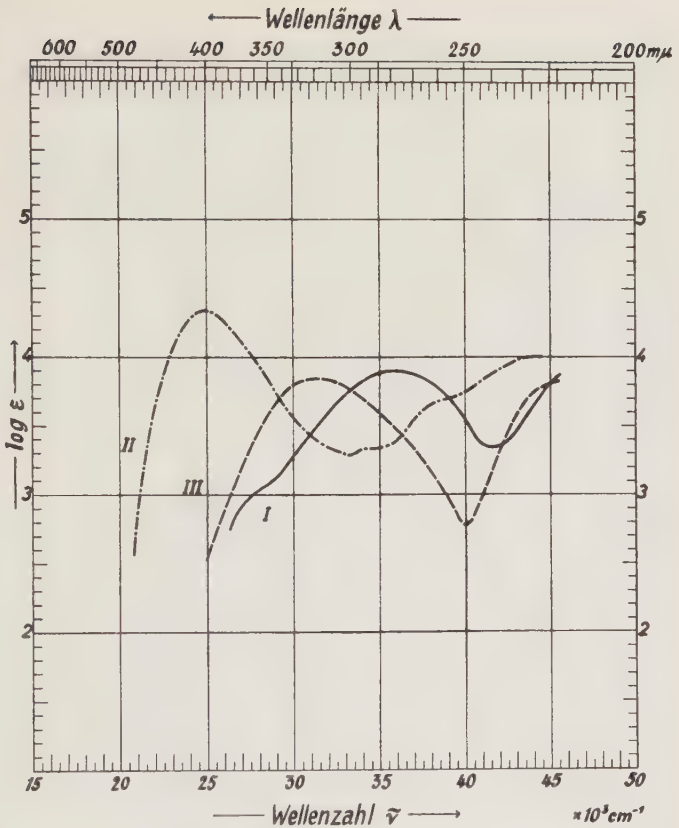


Abbildung 1 (nach POST)

- I E 605-Wirkstoff (Diaethyl-p-Nitrophenyl-Thiophosphat) in H_2O
gegen H_2O
- II E 605-Wirkstoff, gespalten mit NaOH, in H_2O
gegen $\text{H}_2\text{O} + \text{NaOH}$ gleicher Konzentration
- III E 605-Wirkstoff, gespalten mit NaOH,
dann angesäuert mit HCl, in H_2O
gegen $\text{H}_2\text{O} + \text{NaOH} + \text{HCl}$ gleicher Konzentration

Anders liegen die Verhältnisse im Blutfiltrat, das ein Gemisch aus einer Vielzahl von Stoffen darstellt. Bei der Fällung der Eiweißkörper mit Trichloressigsäure gehen nach HALLMANN die übrigen wasserlöslichen Bestandteile des Serums in das Filtrat über. Es sind darin also außer überschüssiger Trichloressigsäure, die sich beim Kochen ohne Rückstand in Chloroform und Kohlendioxyd zersetzen soll (Hinsberg), hauptsächlich folgende Substanzen zu erwarten: Sämtliche Stoffe der Rest-N-Gruppe; Kohlenhydrate, hauptsächlich Glukose; intermediäre Produkte aus dem Kohlenhydrat- und Fettstoffwechsel; Salze; und schließlich auch exogene, im Blut kreisende Substanzen wie Arzneimittel und Giftstoffe; bei Leichenblut außerdem noch postmortale Abbauprodukte.

E 605 wird wegen seiner hohen Toxizität im Blut stets nur in sehr geringen Konzentrationen auftreten; auch bei Aufnahme der akut tödlichen Dosis (nach LENDLE beim Menschen 10 mg/kg) können sich nur sehr niedrige Blutspiegel entwickeln (Gg. SCHMIDT). Darüber hinaus fand v. EICKEN, daß nur ein geringer Anteil des in Konzentrationen zwischen 50 und 500 μ /ml zum Blut zugesetzten E 605 im Trichloressigsäurefiltrat erscheint. Daß nach tödlicher E 605-Vergiftung tatsächlich der unveränderte Wirkstoff im Blut vorliegt, konnten wir auf folgende Art beweisen:

15 ml Blut von einer tödlichen E 605-Vergiftung, welches 2 Wochen lang im Kühlraum aufbewahrt worden war, wurden mit der doppelten Menge Aether versetzt und mit dem Mixer (Ultra-Turrax-Gerät) 3 Minuten lang bearbeitet, dann filtriert. Die leicht getrübe aetherische Phase wurde 2 mal mit Natriumsulfat getrocknet und filtriert, danach der Aether bei Zimmertemperatur in einer Glasschale abgedunstet. Der schmierig-fettige Rückstand wurde in kalter NaOH aufgenommen, die sehr trübe Lösung nach einiger Zeit filtriert. In einem Teil des angesäuerten Filtrates wurde die Indophenolblau-Reaktion in der Modifikation nach WEINIG (1) an-

gestellt. Sie fiel negativ aus. Ein anderer Teil des natron-alkalischen Filtrates wurde erst 1 Minute gekocht; hierbei trat schwache Gelbfärbung auf. Nach Zugabe von HCl bis zu schwach saurer Reaktion wurde die Indophenolblau-Reaktion vorgenommen, die durch das Auftreten einer ganz schwach blauen Färbung diesmal positiv ausfiel. Dann wurde filtriert und das vorsichtig wieder angesäuerte Filtrat mit Aether ausgeschüttelt. Nach Zugabe weniger Tropfen verdünnter NaOH zu dem abgetrennten aetherischen Extrakt zeigte sich in dieser wässrigen Phase am Boden des Reagensglases der angereicherte Farbstoff durch eine deutliche Blaufärbung.

Es muß aber auch damit gerechnet werden, daß Teile des Giftes im Blut intravital bzw. agonal oder postmortal chemische Veränderungen erleiden und sich so dem Nachweis entziehen können. Dafür gibt es folgende Anhaltspunkte:

1) Veränderungen in vivo:

Die Toxizität des E 605 beruht auf der Hemmung der Cholinesterase. Reines Diaethyl-p-Nitrophenyl-Thiophosphat entfaltet diese Wirkung jedoch erst in vivo; in vitro ist es fast unwirksam. Der E 605-Wirkstoff wird nämlich im Insekten- und Warmblüter-Organismus fermentativ in den schwefelfreien Phosphorsäure-Ester E 600 (Paroxon) umgewandelt, welcher der eigentliche Träger der Giftwirkung ist (METCALF u. MARCH; DIGGLE u. GAGE; GAGE; WIRTH; DUSPIVA) und wesentlich leichter hydrolytisch gespalten wird als E 605 selbst (SCHRADER; MÜHLMANN u. SCHRADER).

Nach Verabreichung nicht tödlicher E 605-Mengen wird im Harn p-Nitrophenol ausgeschieden, wahrscheinlich zum größten Teil als Glukuronsäure- und Schwefelsäure-Ester (Literatur bei v. EICKEN). KAISER u. HAAG wiesen in mehreren Vergiftungs-Fällen p-Nitrophenol im Harn bzw. in der Niere nach. Bei einer gewerblichen Vergiftung konnten DEMEY-PONSART, VIVARIO u. HEUSGHEM in Urin, Blut, Leber und Niere E 605 und p-Nitrophenol

nebeneinander nachweisen. Nach akut tödlicher Vergiftung gelingt die Auffindung von p-Nitrophenol in Harn und Niere nicht immer, da der rasche Eintritt des Todes hier offenbar einen stärkeren intravitalen Abbau des Diaethyl-p-Nitrophenyl-Thiophosphates verhindert (v. EICKEN; Gg. SCHMIDT; KAISER u. HAAG).

Nach Verfütterung von p-Nitrophenol (0,2 mg/kg) an Ratten fanden ROBINSON, SMITH u. WILLIAMS im Harn die gesamte Giftdosis wieder. 14 % waren zu p-Aminophenol reduziert, 0,2 % zu 4-Nitrocatechol oxydiert worden, der Rest war unverändert; es wurden 65 % Glukuronsäure, 16 % an Schwefelsäure gebunden ausgeschieden. Eine Übertragung der Ergebnisse auf den Menschen ist wegen der Verschiedenheit der Fermentsysteme nicht ohne weiteres möglich.

Bei manchen schweren Vergiftungen färbt sich das Trichloressigsäurefiltrat des Blutes - im Gegensatz zu reiner E 605-Wirkstoff-Lösung - nach Alkalizusatz schon in der Kälte gelb (SCHWERD u. SCHMIDT). Als Ursache für diese Gelbfärbung kommen in Frage der schwefelfreie Ester E 600 und p-Nitrophenol, evtl. auch das S-Aethyl-Isomere des E 605, welches in E 605-Präparaten meist in Spuren enthalten ist. Alle diese Substanzen sind wasserlöslich und färben sich mit Alkali schon in der Kälte gelb (Gg. SCHMIDT).

2) Veränderungen post mortem:

Im Leichenmagen ist E 605 nur eine gewisse Zeit, höchstens etwa 6 Monate lang, nachweisbar. Die Dauer scheint u.a. von der Giftdosis und der Temperatur abhängig zu sein. Systematische Untersuchungen wurden durch BURGER angestellt; Literatur auch bei WEINIG (2).

In Anbetracht der geringen E 605-Konzentrationen und der Anwesenheit vieler anderer bluteigener Stoffe besteht die Möglichkeit, daß bei der Durchführung der Alkalikochprobe im Trichloressigsäurefiltrat des Blutes außer der Spaltung des Diaethyl-p-Nitrophenyl-Thiophosphates noch viele

andere Reaktionen ablaufen. Diese sind einerseits durch die Einwirkung von Alkali in der Siedehitze auf die übrigen Bestandteile des Filtrates, andererseits durch sekundäre Reaktionen zwischen den Verseifungsprodukten des E 605 und diesen Begleitsubstanzen denkbar. Die folgenden Beobachtungen scheinen diese Vermutung zu bestätigen:

- 1) Auch im Trichloressigsäurefiltrat frisch entnommenen Normalblutes tritt beim Kochen mit Alkali nach einer oder mehreren Minuten eine schwache Gelbfärbung auf. Deshalb ist bei der Probe nach SCHWERD u. SCHMIDT auf die sofort nach dem ersten Aufschäumen eintretende Gelbfärbung zu achten, die dann nicht mehr wesentlich nachdunkelt (Gg. SCHMIDT). Ebenso fand man bei Durchführung der Reaktion mit den Filtraten von E 605-freien Spenderblut- und Leichenblutproben und von wäßrigen Organauszügen fast immer Leerwerte durch eine unspezifische, veränderliche Gelbfärbung, und Absorptionen, die im sichtbaren Bereich der des p-Nitrophenol-Natriums ähnelten (ABELE; KAISER u. HAAG).
- 2) Die Probe liefert bei Vorhandensein von E 605 niemals die grünlichgelbe Farbe des reinen p-Nitrophenolates, sondern mehr goldgelbe Töne, die etwa der Farbe normaler Harnes mäßiger Konzentration gleichkommen (SCHWERD u. SCHMIDT).

Auf Mageninhalt ist die Alkalikochprobe nicht ohne weiteres anwendbar, da sie sehr unspezifisch ist (Literatur bei Gg. SCHMIDT und bei KAISER u. HAAG). Sie kann hier lediglich dazu dienen, eine akute Vergiftung mit E 605 auszuschließen. U.a. färben sich beim Erwärmen mit Alkali auch Glukoselösungen gelb. Es liegt deshalb nahe, für die im alkalisierten Trichloressigsäurefiltrat des Normalblutes bei längerem Kochen entstehende Gelbfärbung ebenfalls die Glukose verantwortlich zu machen. Beim Kochen mit Alkali (MOORE'sche Probe) nehmen die Glukoselösungen eine gelbe, später braune Farbe an. Während dieses Prozesses besitzen sie eine starke

Reduktionskraft und sind fähig, u.a. die Nitrogruppen zahlreicher aromatischer Verbindungen zu reduzieren. Es ist deshalb auch denkbar, daß das p-Nitrophenolat bei seiner Freisetzung aus dem E 605-Molekül in ähnlicher Weise von den in heißer alkalischer Lösung entstehenden, stark reduzierenden Umwandlungsprodukten des Blutzuckers verändert wird. Es wäre dann erklärlich, weshalb beim E 605-Nachweis nach SCHWERD u. SCHMIDT die charakteristische grünlichgelbe Farbe des p-Nitrophenolates vermißt wird.

Diese Überlegungen veranlaßten uns, in der vorliegenden Dissertation Untersuchungen über die Gelbfärbung des p-Nitrophenolnatriums in Gegenwart von Glukose durchzuführen.

A. DIE GELBFÄRBUNG DES P-NITROPHENOL-NATRIUMS

Reines p-Nitrophenol in wäßriger Lösung zeigt einen zarten, zitronengelben Farbton mit einem leichten Stich ins Grünliche. Die Farbe verschwindet beim Ansäuern; bei Zugabe von Alkali verstärkt sich die Gelbfärbung um das Vielfache. Der Farbumschlag von fast farblos nach intensiv gelb erfolgt in dem pH-Bereich zwischen 4,7 und 7,8. In 0,08-prozentiger wäßriger Lösung wird p-Nitrophenol daher als pH-Indikator verwendet (ESSELBORN).

Diesem Verhalten entspricht eine unterschiedliche spektrale Absorption des p-Nitrophenols in saurer und alkalischer Lösung. Die typischen Farbkurven nach POST finden sich in Abb. 2. Die Werte wurden, wie bei allen in dieser Arbeit wiedergegebenen Kurven, mit dem Zeiss-Opton Spektralphotometer mit Monochromator M 4 Q (Ausrüstung mit Quarzoptik, Messung in Quarzküvetten im sichtbaren Bereich und im UV) gewonnen und nach dem Verfahren von PESTEMER u. SCHEIBE aufgetragen. Freies p-Nitrophenol besitzt ein Absorptionsmaximum bei 3200 Å und ein Minimum bei 2500 Å; p-Nitrophenol-Natrium weist je ein Maximum bei 4000 und bei 2350 Å und ein Minimum bei 3000 Å auf und zwischen 3000 und 2350 Å einen wellenförmigen Kurvenverlauf. POST bringt auch einen Überblick über die theoretischen Vorstellungen, welche man sich über das Zustandekommen der Absorptionen bei aromatischen Nitroverbindungen macht. Er stützt sich hierbei hauptsächlich auf die Arbeiten von KORTÜM und von EISENBRAND u. V. HALBAN.

SCHARWIN berichtet, daß die spezifische Farbstärke der wäßrigen und alkoholischen Lösungen des freien p-Nitrophenols mit steigender Verdünnung zunehme. Der Farbgrad laufe der elektrischen Leitfähigkeit parallel, sei also von der Ionisation abhängig. Lösungen von p-Nitrophenol-Natrium gehorchen nach KETELAAR u. HELLINGMAN dagegen dem LAMBERT-BEER'schen Gesetz. Die Autoren nahmen ihre Bestimmungen bei 4050 Å vor. Auch KAISER u. HAAG fanden für wäßrig-

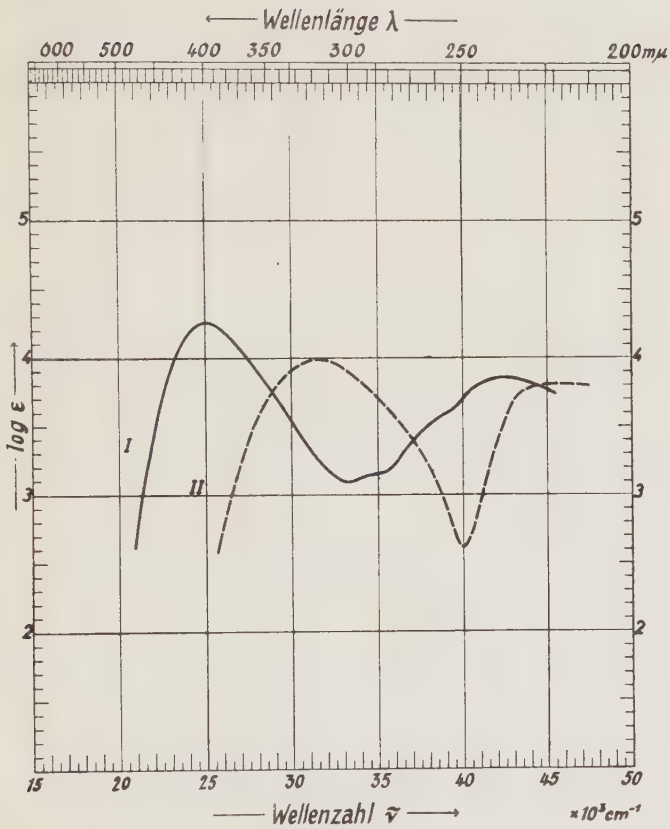


Abbildung 2 (nach POST)

- I p-Nitrophenol + NaOH (p-Nitrophenol-Natrium) in H_2O
gegen $\text{H}_2\text{O} + \text{NaOH}$ gleicher Konzentration
- II p-Nitrophenol + NaOH, angesäuert mit HCl, in H_2O
gegen $\text{H}_2\text{O} + \text{NaOH} + \text{HCl}$ gleicher Konzentration

natronalkalische p-Nitrophenol-Lösungen im Konzentrationsbereich zwischen 5 und 500 μ % eine Gültigkeit des BEER'schen Gesetzes. Sie führten ihre Untersuchungen mit einem Spektrophotometer bei 3950 Å und mit einem Stufen-Photometer mit Filter S 42 durch. Die gewonnenen geradlinigen Eichkurven benützen sie als Grundlage für die Bestimmung von p-Nitrophenol im Harn, welches sie nach einem besonderen Verfahren isolieren.

Bei Farbvergleichen alkalischer p-Nitrophenol-Lösungen mit Hilfe des DUBOSQ-Colorimeters (unter Vorschaltung eines Blaufilters) fanden auch WIR, daß bei Konzentrationen zwischen 0,1 und 10 mg % die Intensität der Gelbfärbung der Konzentration streng proportional ist.

Nach KOLTHOFF ist die elektrolytische Dissoziation des p-Nitrophenols bei erhöhten Temperaturen stärker als bei gewöhnlicher Temperatur.

Die Gelbfärbung der p-Nitrophenol-Natrium-Lösungen nimmt in der Wärme zu, geht aber beim Abkühlen wieder zum Ausgangswert zurück.

Durch Kohle (Carbo medicinalis bzw. Carbo activatus MERCK) wird p-Nitrophenol in wäßriger Lösung teilweise adsorbiert (SCHILOW u. NEKRASSOW; KOLTHOFF u. VAN DER GOOT).

Durch weitere EIGENE UNTERSUCHUNGEN sollte ermittelt werden, welchen Einfluß verschiedene Reagenzien auf die Gelbfärbung des p-Nitrophenol-Natriums ausüben:

I. Trichloressigsäure:

Zusatz einer gleichen Menge 20 %iger Trichloressigsäurelösung (+ NaOH bis zur vollen Gelbfärbung) hatte, außer dem Verdünnungseffekt, auch nach minutenlangem Kochen keinen Einfluß auf die Gelbfärbung des p-Nitrophenol-Natriums. In der Lösung entwickelten sich beim Kochen Gasbläschen und ein deutlicher Chloroformgeruch (vergl. S. 2).

Auch beim Kochen einer reinen E 605-Wirkstoff-Lösung (0,7 mg %) mit Alkali tritt durch Anwesenheit von Trichloressigsäure keine sichtbare Veränderung des Reaktionsablaufes ein, sofern die zur Neutralisierung der Trichloressigsäure notwendige Menge NaOH zusätzlich zugegeben wird.

II. Wasserstoff-Superoxyd:

Da starke Oxydationsmittel in der Lage sind, die in alkalischen Glukoselösungen entstehenden, gelben bis braunen Farbstoffe zu unterdrücken bzw. zu zerstören, haben wir geprüft, ob Wasserstoff-Superoxyd auch die Gelbfärbung des p-Nitrophenolates beeinflusst. In stark verdünnter Lösung (schwach gelb, etwa 0,2 mg %), der auf 10 ml 3 - 4 Tropfen Perhydrol zugesetzt waren, trat bei minutenlangem Kochen eine allmähliche Entfärbung ein.

Der Verlauf der Alkalikochprobe in reiner E 605-Wirkstoff-Lösung (0,7 mg %) wurde durch Zusatz von H_2O_2 (4 Tropfen Perhydrol/4 ml Lösung) charakteristisch verändert. Innerhalb weniger Minuten entwickelte sich die Gelbfärbung schon in der Kälte. Beim Erhitzen trat sie wesentlich schneller ein, als in einer Vergleichsprobe ohne H_2O_2 , verblaßte aber beim weiteren Kochen. In Gegenwart von Wasserstoff-Superoxyd entwickelte sich die gelbe Farbe auch beim Aufkochen mit schwachen Alkalien ($NaHCO_3$, pH = 8,2), welche normalerweise eine Spaltung des E 605-Moleküls nicht herbeiführen. Die Gelbfärbung unterschied sich bei Anwesenheit von H_2O_2 zum Zeitpunkt ihrer vollen Entwicklung in Ton und Grad nicht von derjenigen, welche bei der Durchführung der gewöhnlichen Alkali-Kochprobe in der gleichen E 605-Wirkstoff-Lösung entstand. SCHRADER berichtet, daß E 605 durch starke Oxydationsmittel in den schwefelfreien Phosphorsäureester (E 600, Paroxon) und Schwefelsäure übergeführt wird. E 600

wird bei pH-Werten zwischen 7,5 und 10 relativ schnell verseift. Es wäre also möglich, daß bei der Einwirkung von Wasserstoff-Superoxyd auf E 605 auf dem Umweg über E 600 ebenfalls p-Nitrophenol entsteht.

Der durch den Zusatz von H_2O_2 verursachte Effekt auf den Verlauf der Alkalikochprobe in reiner E 605-Wirkstoff-Lösung trat auch in Anwesenheit von Trichlor-essigsäure ein.

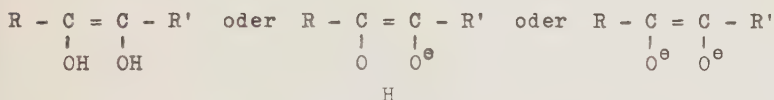
B. DIE GELBFÄRBUNG IN ALKALISCHEN GLUKOSELÖSUNGEN

I) CHEMISCHE VORGÄNGE IN ALKALISCHEN GLUKOSELÖSUNGEN

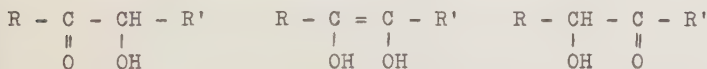
In neutralem oder schwach saurem Medium ist die Glukose relativ beständig; bei pH-Werten zwischen 3 und 4 erreicht sie ihre größte Stabilität (KRÖNER U. KOTHE).

In alkalischer Lösung dagegen erleidet sie tiefgreifende Veränderungen, deren Ausmaß u.a. von der Temperatur und von Konzentration und Einwirkungszeit des Alkalis abhängt. Dabei entwickeln die Lösungen, je nach den Bedingungen, ein mehr oder minder deutlich ausgeprägtes Reduktionsvermögen.

Verantwortlich für die Reduktionswirkung sind die sehr reaktionsfähigen Umwandlungsprodukte, welche im alkalischen Medium aus der Glukose entstehen. Es handelt sich um eine Vielzahl von ähnlichen Verbindungen, die sich alle durch den Besitz einer Endiol-Gruppierung auszeichnen:



Sie sind die tautomeren Enolformen von α -Hydroxycarbonylverbindungen ("Ketolen"), wobei jeweils 2 isomere Ketole eine gemeinsame Enolform besitzen:



Bei der Oxydation entsteht die entsprechende Diketoverbindung:



Beständigkeit, d.h. Lage des Keto-Enol-Gleichgewichtes,

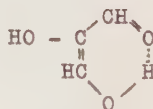
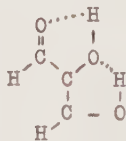
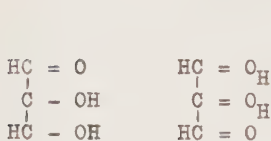
und Reaktionsbereitschaft der Endiol-Gruppe werden durch benachbarte Gruppen stark beeinflusst, was zu wesentlichen Unterschieden innerhalb dieser Stoffklasse führt:

Die Mehrzahl der bei Alkalibehandlung von Glukose entstehenden Endiole ist nur bei alkalischer Reaktion, d.h. in Form des Anions bzw. des Alkalisalzes beständig. Man spricht deshalb von Endiolaten oder Reduktonaten. Sie zeigen von pH 7 ab eine mit steigender Hydroxylionen-Konzentration zunehmende Reduktionswirkung, welche zunächst auf dem Vorhandensein des Monoanions beruht. Oberhalb pH 9,5 kann auch noch ein zweites H-Ion abdissoziiert werden (V. EULER U. HASSELQUIST (4)).

Andere Endiole behalten ihre Struktur und ihre Reduktionskraft auch in saurer Lösung bei. Sie werden als Reduktone im engeren Sinne oder als aci-Reduktone bezeichnet. Ihre Beständigkeit wird darauf zurückgeführt, daß sie benachbart zur Endiol-Gruppe eine Carbonylgruppe tragen. Dadurch entstehen konjugierte Doppelbindungen, die sich durch Mesomerie weiter stabilisieren:



Die aci-Reduktone leiten sich von α -Hydroxy- β -Dicarbonylverbindungen ab. Ihr einfachster und am gründlichsten untersuchter Vertreter ist das Triose-Redukton $\text{C}_3\text{H}_4\text{O}_3$, welches neben anderen aci-Reduktonen ebenfalls bei der Alkalibehandlung von Glukose entsteht (Isolierung als Bleisalz bzw. als Dianil-Hydrochlorid, Ausbeute bis zu 0,1 Mol/Mol Glukose). Formeln:



Cis-Endiol-Form

Trans-Endiol-Form

(Doppel-5-Ring-Chelat)

(6-Ring-Chelat)

In Abwesenheit starker Säuren bildet das Trans-Isomere den Chelat-Ring aus. Es ist dann wesentlich reaktions-träger als die Cis-Modifikation. In Lösung liegen viel-leicht Gleichgewichte beider Formen vor.

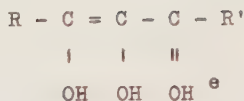
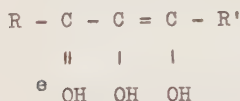
Im Triose-Redukton ist an beide endständige C-Atome je ein Wasserstoff-Atom direkt gebunden. Denkt man sich davon eines oder auch beide durch verschiedene Reste ersetzt, so erhält man die Formeln für andere aci-Re-duktone. Unter diesen kommt die größte Bedeutung der Ascorbinsäure zu.

Reines Triose-Redukton ist eine farblose Substanz. die - je nach den Anteilen der cis- und trans-isomeren Form - zwischen 143 und 153° schmilzt. In braunen Gefäßen ist Triose-Redukton im Eisschrank längere Zeit haltbar. Es ist leicht löslich in Wasser, Methanol, Aethanol und Ace-ton, wenig löslich in Aether und Benzol, fast unlöslich in gesättigten Kohlenwasserstoffen. Bei hohen Temperaturen polymerisiert es zu einem braunen, nicht mehr reduzierenden Harz (NELSON u. BROWNE; V. EULER u. MARTIUS; V. EULER, HASSELQUIST u. GLASER).

In wäßeriger Lösung reagieren die aci-Reduktone als Säuren, sie stehen also mit ihren Mono-Anionen im Gleichgewicht. Lösungen der undissoziierten aci-Reduktone erhält man des-halb nur dann, wenn man ihre Dissoziation durch Zusatz kleiner HCl-Mengen zurückdrängt. Die 1. Dissoziationskon-stante (für die endständige OH-Gruppe) des Triosereduktions hat den Wert $K_1 = 1,17 \cdot 10^{-5}$. Sie ist nur wenig niedriger als die der Essigsäure ($K = 1,76 \cdot 10^{-5}$). Die Dissoziations-konstante K_2 der mittelständigen OH-Gruppe wird auf 10^{-12} bis 10^{-14} geschätzt; genauere Messungen scheiterten daran, daß sich die Di-Anionen bei den notwendigen hohen Alkali-konzentrationen rasch weiter verändern. Die Mono-Anionen sind im Gegensatz dazu relativ stabil.

In stark saurer Lösung können die aci-Reduktone durch Aufnahme je eines Wasserstoff-Ions Enoloxonium-Kationen bzw. deren Salze bilden und sind unter diesen Bedingungen

gegen Luft sehr beständig:



Die aci-Reduktone reagieren also amphoter. In der Nähe des Neutralpunktes weisen sie ein Minimum an Reaktionsbereitschaft auf.

Endirole reduzieren Dichlorphenol-Indophenol (TILLMANS-Reagens) zu farblosem Leuko-Dichlorphenol-Indophenol und Methylenblau zu Leuko-Methylenblau. Mit Hilfe dieser Farbreaktionen werden sie am häufigsten bestimmt. Die Endiolgruppe wird auch durch Luft-Sauerstoff oxydiert. Chemische Operationen mit Reduktionen müssen deshalb unter Luftabschluß, am besten in Stickstoff-Atmosphäre, vorgenommen werden.

Die Chemie der Reduktone und Reduktonate ist bei V. EULER u. EISTERT ausführlich dargestellt. Einen Überblick über die chemischen Reaktionen bei der Einwirkung von Alkalien auf Glukoselösungen findet man bei PIGMAN u. GOEPP. Auf die Vorstellungen, die man sich heute über diese Vorgänge macht, sei in den folgenden Abschnitten kurz eingegangen.

a) Reaktionsablauf in Abwesenheit von Oxydationsmitteln

1) Mutarotation

Alkalien begünstigen zunächst, und zwar schon unter den mildesten Bedingungen, die Umlagerungen zwischen der α - und β -Modifikation der Glukose, welche unter Änderung der optischen Drehung zur Einstellung eines Gleichgewichtes führen. Der Vorgang soll nach V. EULER, HASSELQUIST u. HANSHOFF (1) durch die Ionen der Glukose vermittelt werden. Er wird durch OH-Ionen, in geringerem Maße auch durch H-Ionen, katalysiert. Die Mutarotation der Glukose verläuft

deshalb bei pH-Werten zwischen 3,0 und 7,0 langsam und hat bei pH 4,61 ihre geringste Geschwindigkeit. In stärker alkalischen Lösungen geht sie momentan vor sich. Die pH-Abhängigkeit der Mutarotation der Glukose ist in der Formel von HUDSON rechnerisch erfaßt (PIGMAN u. GOEPP). Die meisten Autoren (PIGMAN u. GOEPP; V. EULER, HASSELQUIST u. HANSHOFF (1)) vermuten, daß die Einstellung des Gleichgewichts über die offenkettige Aldehydform der Glukose verläuft. PETUELY u. MEIXNER sind dagegen der Meinung, daß sie ohne Öffnung des Lactonringes erfolgt.

2) Isomerisierungen, vorwiegend am reduzierenden Ende des Moleküls:

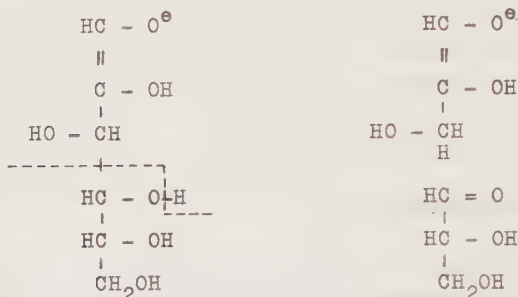
Als erstes, einfaches Umwandlungsprodukt der Glukose entsteht schon bei schwach alkalischer Reaktion durch Ausbildung einer endständigen Endiol-Gruppe ein 1,2-Endiolat-Anion, die gemeinsame Endiol-Form dreier isomerer Hexosen. Bei der Rückverwandlung in die Ketolform ergibt das Endiolat dementsprechend ein Gemisch aus Glukose, Mannose und Fructose. Darauf beruht die von DE BRUYN u. VAN EKENSTEIN (1) entdeckte gegenseitige Umwandlung dieser Zuckerarten ineinander. Es stellt sich unter Abnahme der optischen Drehung ein beschränkter Gleichgewichtszustand ein.

Bei stärkerer oder längerer Alkalieinwirkung wandert die Endiolgruppierung entlang der Kohlenstoffkette weiter und bewirkt auch an den übrigen C-Atomen Isomerisierungen. Unter milden Bedingungen schreitet der Prozeß wahrscheinlich über die 2,3-Endiol-Stufe nicht hinaus (PIGMAN u. GOEPP).

3) Molekülzerfall

Unter dem Einfluß höherer Alkalikonzentrationen tritt außerdem, und zwar bevorzugt zwischen C₃ und C₄, ein Zerfall der Endiolate ein. Nach der Theorie von NEF (2, 3, 4) geschieht dies an der Stelle der

Doppelbindung, nach neuerer Auffassung (SCHMIDT; V. EULER u. EISTERT) jedoch am nächsten Kohlenstoffatom (Allylstellung). Es handelt sich um eine Retroaldolspaltung:



So entstehen aus den 1,2-Endiolen durch Zerfall zwischen C_3 und C_4 große Mengen Triosen, aus den 2,3-Endiolen (Zerfall zwischen C_4 und C_5) Tetrosen + Biosen, aus den 3,4-Endiolen (Zerfall zwischen C_5 und C_6) Pentosen + Formaldehyd. Die Spaltstücke können ihrerseits wieder in Endiolatformen übergehen und Isomerisierung erleiden. Die Triosen, d,l-Glyzerinaldehyd und Dioxyaceton, stehen in alkalischer Lösung über ihre Endiolatform miteinander im Gleichgewicht (EVANS u. MITARB. (1,2,4); FISCHLER (2); WOHL u. NEUBERG).

Die Triosen sind besonders alkali-empfindlich. Versuche haben ergeben, daß sie unter sehr schwach alkalischen Bedingungen durch Aldolkondensation Hexosen bilden können (WOHL u. NEUBERG; SCHMITZ; FISCHER u. BAER; BERL u. FEAZEL (1)). Der Vorgang der Retroaldolspaltung ist also reversibel.

4) Reduktonbildung

Ein kleiner Teil der neu entstandenen Endiolate liefert Reduktone. So disproportioniert sich z.B. das

Triose-Endiolat zu Triose-Redukton und Acetol, und in analoger Weise entstehen aus den übrigen Spaltstücken aci-Reduktone mit 4 und 5 C-Atomen. Die maximale Ausbeute an stabilen aci-Reduktonen, bestimmt durch Titration mit Tillmans-Reagens, beträgt etwa 0,22 Mol/Mol Glukose (V. EULER u. EISTERT).

Andere Autoren vermuten, daß das Glukosemolekül direkt in Redukton und Acetol gespalten wird (SÄTTLER u. ZERBAN), oder daß durch Zerfall von 2 Molekülen Glukose 1 Molekül Redukton, 2 Moleküle Brenztraubenaldehyd und ein Molekül Hydroxybrenztraubenaldehyd bzw. Dioxyaceton entstehen (MONTGOMERY (1)).

5) Säurebildung

Unter dem Einfluß größerer Alkalimengen kommt es außerdem zur Bildung von Saccharinsäuren $C_nH_{2n}O_n$ mit gleicher Anzahl von C-Atomen wie die Ausgangsverbindungen. Sie entstehen nach NEF (3), EVANS, ISBELL aus den instabilen Endiolen der Hexosen und ihrer Spaltstücke durch spontane Umlagerung, wobei das intermediäre Auftreten von Diketoverbindungen (o-Osonen) angenommen wird (NEF (3); EVANS u. MITARB. (2,5,6)). Bei stark alkalischer Reaktion erhält man als Hauptprodukt d,l Milchsäure (Ausbeute bis zu 1,2 Mol/Mol Glukose), welche als Saccharinsäure des Glycerinaldehyds aufgefaßt werden kann. Sie entstammt dem Endiolat der Triosen; als Zwischenstufe gilt Methylglyoxal (NEF (1,2); EVANS u. MITARB. (1,2,4,5,6); FISCHLER, HAUSS u. TÄUFEL; BERNHAUER u. GÖRLICH). Dieses liefert bei mäßigen Alkalikonzentrationen statt Milchsäure Essigsäure und Ameisensäure.

BERNHAUER u. GÖRLICH behandelten Methylglyoxal-Lösungen mit Erdalkali-Carbonaten. Sie konnten nachweisen, daß unter so milden Bedingungen Triosen und Hexosen entstehen. Es ist also offenbar auch die

Bildung von Methylglyoxal aus Triose-Endiol ein reversibler Vorgang. DAKIN u. DUDLEY haben in wäßriger Lösung auch eine teilweise Umwandlung von Milchsäure in Methylglyoxal erreicht. Im alkalischen Medium jedoch ist die Säurebildung nicht umkehrbar; die Säuren stellen stabile Endprodukte dar (NEF (2)).

6) Polymerisation

Durch Polymerisation intermediärer Spaltprodukte bilden sich außerdem stets auch unterschiedliche Mengen rotbrauner Harze, welche in dem Kapitel über den Glukosefarbstoff näher besprochen werden sollen.

7) Endzustand

Ist genügend Alkali vorhanden, so hören die Umsetzungen erst dann auf, wenn aller Zucker zerstört und in stabile Endprodukte (Säuren und Harze) übergeführt ist. Unter schwach alkalischen Bedingungen findet nur ein teilweiser Abbau statt. Die Reaktion bleibt dann auf verschiedenen Stufen stehen und es sind weniger stabile Produkte faßbar.

Das Verhalten des Reduktionsvermögens

Neutrale Glukoselösungen sind gegen Oxydationsmittel ziemlich beständig. Sie reagieren weder mit TILLMANS-REAGENS noch mit Methylenblau. In Abwesenheit von Salzen werden sie durch Permanganat praktisch nicht angegriffen (ARMSTRONG u. HILDITSCH) und auch durch H_2O_2 in der Kälte kaum oxydiert.

Alkalische Glukoselösungen besitzen dagegen ein mehr oder minder stark ausgeprägtes Reduktionsvermögen und werden schon durch Luftsauerstoff oxydiert (SCHEIBLER (2); JOLLES (3,5); POWER u. UPSON; FRAMM). Die Oxydierbarkeit hängt in ihrem Ausmaß nicht nur von der Wasserstoffionen-Konzentration ab, sondern u.a. auch davon, in welcher Menge (NEF (2)), bei welcher Temperatur und wie lange (ARMSTRONG u. HILDITSCH) das Alkali vorher auf die Glukose einge-

wirkt hat. Die Reduktionskraft* ist dann am größten, wenn sehr viele labile, intermediäre Reaktionsprodukte (Reduktonate, insbesondere Triosen) vorliegen; mit zunehmender Umwandlung dieser Spaltstücke in stabile Endprodukte (hauptsächlich Säuren) nimmt sie wieder ab und kann schließlich ganz verschwinden (vergl. BENEDICT (1)).

Mit Alkali vorbehandelte Glukoselösungen behalten auch nach dem Ansäuern eine gewisse Reduktionsfähigkeit gegenüber TILLMANS-Reagens, Methylenblau, Permanganat, Ferri- und Cupri-Salzen. Diese Eigenschaft beruht auf der Anwesenheit von aci-Reduktonen, welche unter dem Einfluß des Alkalis aus Glukose entstehen (V. EULER u. MALM). Die Ausbeute an aci-Reduktonen ist ebenfalls von den oben erwähnten Faktoren abhängig. Sie erreicht mit der Zeit einen Höchstwert, nach dessen Überschreitung sie wieder absinkt (V. EULER u. EISTERT). Aci-Reduktone sind nämlich im alkalischen Medium, insbesondere in Gegenwart anderer Zuckerabbauprodukte und organischer Verunreinigungen, unbeständig und werden auch unter Luftausschluß langsam zerstört (V. EULER u. EISTERT; V. EULER u. MARTIUS; NELSON u. BROWNE).

b) Reaktionsablauf in Gegenwart von Oxydationsmitteln

Bei der Oxydation von Glukose in alkalischer Lösung bestehen nur in Ausnahmefällen stöchiometrische Beziehungen zwischen Glukosemenge und Verbrauch an Oxydationsmittel. Deshalb muß man sich bei der quantitativen Auswertung der Ergebnisse (quantitative Glukosebestimmung) empirischer, unter genau gleichen Bedingungen gewonnener Eichkurven oder Tabellen bedienen. Als Oxydationsprodukte der primär gebildeten Endiolate entstehen nämlich neue Reduktonate (Osone) und aci-Reduktone, welche bei weiterer Einwirkung des Oxydationsmittels bevorzugt abgebaut werden. Unter schwach alkalischen Bedingungen erleiden so wahrscheinlich größere Anteile des Zuckers in derselben Lösung nur

Isomerisierung, während andere einem weitgehenden Abbau unterliegen (V. EULER u. EISTERT). Unter stärkerer Alkalieinwirkung ist außerdem mit dem Auftreten der oben beschriebenen Spaltstücke zu rechnen, welche besonders leicht oxydiert werden können. Dementsprechend wurden die verschiedensten Reaktionsprodukte nachgewiesen: Hexonsäuren, Pentonsäuren, Tetronsäuren, Glycerinsäure, Glykolsäure, Oxalsäure, Essigsäure, Ameisensäure, Kohlensäure, Acetaldehyd, Formaldehyd, Spuren von Aethylalkohol (FISCHLER u. REIL; BUCHNER, MEISENHEIMER u. SCHADE; NEF (2,4); EVANS u. MITARB. (1,2,3); JOLLES (3,5); POWER u. UPSON; FRAMM). Durch diese sauren Oxydationsprodukte, die sich z.T. schon unter der Einwirkung des Luftsauerstoffes bilden, tritt gegenüber dem nicht-oxydativen alkalischen Glukoseabbau ein vermehrter Alkaliverbrauch ein (JOLLES (3,5)). Bei ausreichender Oxydationswirkung bleibt die Bildung von Milchsäure und von Harzen aus (FRAMM u.a.).

Auch mit den reaktionsfähigen Spaltprodukten, welche bei der Einwirkung von Alkalien aus Glukose entstehen, wurden Oxydationsversuche angestellt. EVANS u. MITARB (1, 2,3) verfolgten die Oxydation von Glyzerinaldehyd mit NaMnO_4 bei verschiedenen NaOH-Konzentrationen und verschiedenen Temperaturen, und FISCHLER u. REIL ließen bei der Destillation sehr schwach alkalischer Methylglyoxal-lösungen Oxydationsmittel einwirken. In beiden Fällen entsprachen die Ergebnisse denjenigen, welche unter denselben Bedingungen mit Glukose erzielt wurden. Das primäre Oxydationsprodukt des Triose-Reduktions ist Mesoxal-Dialdehyd (V. EULER u. EISTERT).

c) Die Abhängigkeit des Reaktionsablaufes von anderen Faktoren:

Die chemischen Vorgänge in alkalischen Glukoselösungen sind außerordentlich vielgestaltig. Nur unter genau glei-

chen Bedingungen erhält man vergleichbare Ergebnisse. Deshalb haben zahlreiche Forscher sich mit der Frage beschäftigt, welche Wirkung die Variation verschiedener Faktoren auf die Ergebnisse ausübt. Systematische Untersuchungen wurden u.a. angestellt durch EVANS u. MITARB. (1,2,3,5); FISCHLER, TÄUFEL u. SOUCI; SHAFFER u. FRIEDEMANN; WINDISCH, KOLBACH u. RUCKDESCHEL; MONTGOMERY (1).

Die intermediären Reaktionsteilnehmer sind labil und oft schwierig zu fassen. In den meisten Fällen hat man die unterschiedlichen Reaktionsabläufe deshalb mit Hilfe der gebildeten Mengen an stabilen Endprodukten verglichen. Im Hinblick auf die technisch wichtige Erzeugung von Milchsäure aus Zuckerarten wurden insbesondere die Ausbeuten an Milchsäure untersucht (WINDISCH, KOLBACH u. RUCKDESCHEL; MONTGOMERY (1); letzterer bringt auch eine ausführliche Literaturübersicht). Auch mit Triosen wurden Versuchsreihen durchgeführt (EVANS u. MITARB. (1,2,3,4,6)).

Proportionale Beziehungen zwischen Versuchs-Bedingungen und Resultaten wurden nur ausnahmsweise und jeweils nur für einen ganz engen Bereich gefunden.

1) Alkalimenge

Der entscheidenste Einfluß auf den alkalischen Zuckerabbau kommt der Alkalimenge zu. Allgemein ist zu sagen, daß Geschwindigkeit und Umfang der Veränderungen durch steigende Alkalikonzentrationen gefördert werden. Es kommt zunächst zu Isomerisierungen, von einem gewissen Alkalitätsgrad ab in zunehmendem Maße auch zu Molekülzerfall und Säurebildung.

Bei der Einwirkung von schwach bis mäßig konzentrierter NaOH auf Glukoselösung in der Kälte fanden V. EULER u. HASSELQUIST (1) eine mit zunehmender Alkalimenge rasch ansteigende Bildung von aci-Reduktonen. NEF (1) wies unter ähnlichen Bedingungen Methylglyoxal nach.

Beim Kochen wurde in sehr schwach alkalischer Glukoselösung ebenfalls Methylglyoxal gefunden (NEUBERG u.

OERTEL; NEUBERG u. REWALD); bei Verwendung von Erdalkalicarbonaten (BERNHAEUER u. WOLF) bzw. bei Zusatz von Na-Sulfit (FISCHLER (2)) ließen sich in der Lösung bzw. im Destillat sogar Triosen nachweisen.

Werden Glyzerinaldehyd enthaltende Lösungen bei schwach saurer Reaktion destilliert, so erhält man im Destillat nach FISCHLER (2) und THORNTON u. SPECK Methylglyoxal. Die Nachprüfung durch NODZU u. GOTO ergab jedoch, daß unter den Bedingungen von FISCHLER (2) (Kochen einer bicarbonat-alkalischen, Na_2SO_3 -haltigen Glukoselösung im CO_2 -Strom, Destillation nach dem Ansäuern) das Destillat wahrscheinlich nicht Methylglyoxal, sondern Acetol enthält. Acetol wurde auch im Wasserdampf-Destillat neutraler oder schwach alkalischer Zuckerlösungen nachgewiesen (BAUDISCH u. DEUEL).

In stärker alkalischer Lösung sind diese intermediären Produkte nicht faßbar. Methylglyoxal zerfällt bei mäßigen Alkalikonzentrationen in Acetaldehyd und Kohlenoxyd (die Ausbeuten an Essig- und Ameisensäure erreichen deshalb hier ein Maximum); stark alkalische Lösungen begünstigen seine Umwandlung in Milchsäure (EVANS u. MITARB. (1,2,4,5,6)). Die Milchsäuremenge erreicht bald einen Grenzwert, auf welchen eine weitere Steigerung der Alkalikonzentration keinen Einfluß mehr ausübt. Dagegen soll die Gesamtmenge an Säuren bei begrenzter Versuchsdauer nach FISCHLER, TÄUFEL u. SOUCI bei sehr hohen Alkali-Konzentrationen wieder langsam absinken.

Werden die Versuche bis zum Aufbrauch des Zuckers ausgedehnt, so sind bei geringen Alkali-Konzentrationen die Ausbeuten an Milchsäure kleiner, die entstehenden Harzmengen wesentlich größer als bei hohen.

Die Reaktionsgeschwindigkeit war bei NaOH-Konzentrationen zwischen 1,25 und 5 n der Alkali-Konzentration proportional (WINDISCH, KOLBACH u. RUCKDESCHEL).

Bei gleichzeitiger Einwirkung von Alkali und von Oxydationsmitteln ändern sich die Sauerstoffaufnahme der Glukoselösungen und die Zusammensetzung der Reaktionsprodukte mit der Alkalikonzentration (Kurven bei EVANS u. MITARB. (1,2,3)).

2) Glukosemenge

Der Ablauf der Reaktion ist nicht einfach abhängig von der OH-Ionen-Konzentration. Glukose verhält sich in wäßriger Lösung wie eine sehr schwache Säure. Ihre Dissoziationskonstante beträgt $K = 6 \cdot 10^{-13}$ (V. EULER, HASSELQUIST u. HANSHOFF). Sie vereinigt sich mit NaOH zu einem Monoatriumsalz, welches in Lösung zum großen Teil Hydrolyse erleidet (POWELL). Die beim Zuckerabbau entstehenden Säuren bewirken einen starken Alkaliverbrauch, welcher die Menge des freien Alkali herabsetzt; bei fortschreitender Reaktion kommt es deshalb durch zunehmende Neutralisierung zur Verlangsamung, u.U. sogar zum Stillstand der Reaktion. So ist es verständlich, daß bei der Einwirkung von Alkali auf Zucker auch die Glukosemenge oder, genauer ausgedrückt, das molekulare Verhältnis zwischen Glukose und Alkali von Bedeutung ist. Herabsetzung der Zuckermenge verbessert die Ausbeute an Milchsäure (FISCHLER, TAUFEL u. SOUCI; WINDISCH, KOLBACH u. RUCKDESCHEL; SHAFFER u. FRIEDEMANN).

Die Geschwindigkeit der Zuckerzersetzung hängt nach POWELL von der Konzentration des überschüssigen Alkali ab und das undissoziierte Dextrosat nimmt an der Reaktion nicht teil; nach SCHADE ist sie von der Hydroxylionen-Konzentration abhängig. Dagegen berichtet GROOT, daß die Geschwindigkeit der Isomerisierungen am größten sei, wenn - unabhängig von der Konzentration - Zucker und Alkali im monomolekularen Verhältnis aufeinander einwirken können, und SHAFFER u. FRIEDEMANN fanden die Ausbeute an Milchsäure in gewissen Grenzen

abhängig von der Größe des salzartig gebundenen Zuckeranteils. Die letztgenannten Autoren nehmen an, daß Alkalität und Temperatur die Zucker durch Salzbildung und folgende Ionisierung aktivieren, und daß die Zusammensetzung der Reaktionsprodukte abhängig ist von dem Verhältnis der verschiedenen möglichen Ionenarten. Diese Erklärung scheint uns am ehesten geeignet, die Vielfalt der Erscheinungen zu deuten.

3) Art der Kationen

Viele anorganische und organische Basen wurden daraufhin geprüft, ob sie auf Glukose in gleicher Weise einwirken wie NaOH. Die Ergebnisse waren nur mit KOH dieselben; bei Verwendung anderer Arten von Kationen wichen sie mehr oder minder stark von jenen ab, welche mit NaOH gleicher molarer Konzentrationen erzielt wurden (NEF (4); UTSON; DE BRUYN u. VAN EKENSTEIN; WINDISCH, KOLBACH u. RUCKDESCHEL). In vielen Fällen ist es möglich, die Abweichungen in der Zusammensetzung der Reaktionsprodukte mit dem unterschiedlichen Dissoziationsgrad der verwendeten Basen, also mit Unterschieden in der Hydroxylionen-Konzentration, zu erklären (MURSCHHAUSER (3); JOLLES (4)). Wenn man jedoch bedenkt, daß die verschiedenen ein- und mehrbasischen Kationen mit Glukose und ihren Abbauprodukten Salze von unterschiedlicher Löslichkeit und unterschiedlichem Dissoziationsgrad bilden können, so wird es durchaus verständlich, daß manche Basen sog. "spezifische Wirkungen" haben, d.h., daß sie die Bildung bestimmter Reaktionsprodukte begünstigen. So soll z.B. nach V. EULER, HASSELQUIST u. HANSHOFF (2) die Entstehung von Trioseredukton durch Kupfer-Ionen katalysiert werden, und nach SPECK sollen Amine die Zuckerspaltung katalytisch fördern. Mit $\text{Ba}(\text{OH})_2$ sind die Ausbeuten an Milchsäure besonders hoch (WINDISCH, KOLBACH u. RUCKDESCHEL).

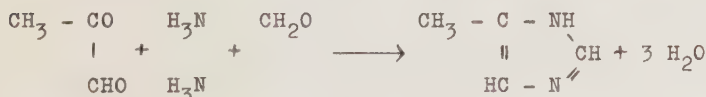
Ammoniak

Hier sei lediglich auf die spezifische Wirkung des Ammoniak etwas näher eingegangen. Nach NEF (4); DE BRUYN u. VAN EKENSTEIN (1); JOLLES (4); HOUGH, JONES u. RICHARDS bewirkt Ammoniak in Glukoselösungen dieselben Isomerisierungen wie andere schwache Alkalien; für das Ausmaß der Umwandlungen ist nach JOLLES (4) die Hydroxylionen-Konzentration entscheidend.

Löst man Glukose in ammoniakhaltigem Wasser, so tritt schon bei gewöhnlicher Temperatur allmähliche Abnahme der Alkalität unter gleichzeitiger Gelb- bis Braunfärbung ein (SCHEIBLER (2)); bei 37° beobachteten auch HOUGH, JONES u. RICHARDS eine rötlichbraune Verfärbung der mit Ammoniak behandelten Glukoselösungen. Dies deutet darauf hin, daß unter dem Einfluß des Ammoniak auch ein tiefgreifenderer Abbau der Glukose möglich ist.

Beim Erhitzen ammoniakalischer Glukoselösungen entwickelt sich nach UNSEREN BEOBACHTUNGEN immer eine gelbe bis braune Farbe.

Wirkt Ammoniak in Gegenwart stärkerer Basen ($\text{Zn}(\text{OH})_2$ oder KOH , NaOH , $\text{Cd}(\text{OH})_2$) auf konzentrierte Glukoselösung ein, so entsteht unter tiefer Braunfärbung innerhalb von Wochen das Metallsalz des $\alpha(\beta)$ -Methylimidazols, wahrscheinlich durch Kondensation von Methylglyoxal, Ammoniak und Formaldehyd (WINDAUS u. KNOOP und KNOOP u. WINDAUS):



Durch Zusatz von Ammoniak soll es möglich sein, schwach natronalkalische Glukoselösungen bei vorsichtigem Erwärmen farblos zu erhalten. SCHADE sowie BUCHNER, MEISENHEIMER u. SCHADE erklären dies damit, daß NH_3

die Aldehydgruppen binde und so die Polymerisation der niedrig-molekularen Hydroxy-Aldehyde (z.B. des Glyzerinaldehyds) zu Harzen verhindere. Nach FIESER U. FIESER entsteht aus Aldehyd und Ammoniak wahrscheinlich ein Additionsprodukt vom Typ



aus welchem mit Hilfe verdünnter Mineralsäuren der Aldehyd zurückgewonnen werden kann.

Zur Nachprüfung dieser Angaben stellten wir EIGENE VERSUCHE an. Beim Kochen der mehr oder minder stark natron-alkalischen Glukoselösungen mit Ammoniak gelang es uns in keinem Falle, die Entwicklung von Farbe ganz zu unterbinden. Dagegen ließ sich durch reichlichen NH_3 -Zusatz der Eintritt der Gelbfärbung hinauszögern und ihr Grad so lange niedrig halten, wie noch freies NH_3 in der Lösung vorhanden und durch die Geruchspröbe nachweisbar war. Nach dem Verschwinden des Ammoniakgeruches verlief die weitere Farbstoff-Bildung wie gewöhnlich.

4) Anionen

Salze zwischen starken Basen und schwachen Säuren kommen in der Wirkung im großen und ganzen verdünnten Alkalien gleich; d.h., ihre Wirkung beruht auf der Hydrolyse, welche sie in Wasser erleiden. Sind genügende Salzmenge vorhanden, so werden sich bei der (alkaliverbrauchenden) Reaktion mit Glukose die Konzentrationen der in Lösung befindlichen, dissoziierten Kationen und der Hydroxylionen nicht so rasch ändern wie in verdünnter Alkalilösung der gleichen Wasserstoffionen-Konzentration. Dadurch ist mit einer größeren Konstanz der Reaktionsbedingungen und der Reaktionsgeschwindigkeiten zu rechnen. Die alkalisch reagieren-

den Salze haben also einen Puffereffekt. Man hat die Carbonate und Bicarbonate, Phosphate, Acetate und Tartrate von Alkalimetallen deshalb häufig dann verwendet, wenn man die Veränderungen der Glukose unter mäßig oder schwach alkalischen Bedingungen studieren wollte (FISCHLER (1,2); NEF (4); SPOHR U. STRAIN (1,3); NEUBERG U. ORTEL; NEUBERG U. REWALD; FERNBACH U. SCHOEN; DE BRUYN U. VAN EKENSTEIN; BENEDICT (1); WINDISCH, KOLBACH u. RUCKDESCHEL; KUHN U. WAGNER-JAUREGG). Dabei ist bemerkenswert, daß Phosphatmischungen auch bei neutraler, sogar bei schwach saurer Reaktion (bis herab zu einem pH von 5,6) die oxydative Glykolyse durch H_2O_2 begünstigen, wobei die Reaktionsgeschwindigkeit bei gleichbleibendem pH mit der absoluten Menge der zugesetzten Phosphate steigt (LÖB). Man wird dies darauf zurückführen dürfen, daß durch den Phosphatpuffer die sauren Oxydationsprodukte abgefangen werden.

Die Reaktionszeiten für die Entfärbung von TILLMANS-Reagens und Methylenblau durch aci-Reduktone, gemessen bei variierendem pH, erreichen in der Nähe des Neutralpunktes ein Maximum. Es ist gleichbedeutend mit einem Minimum an Reaktionsbereitschaft und liegt für Trioseredukton bei pH 8,9. Die Lage dieses Punktes wird durch Zitrat-, Glycinat-, Borat- und Phosphatpuffer stark beeinflusst, sie kann bis zu 2 pH-Einheiten verschoben werden (V. EULER, HASSELQUIST U. CEDER (1); V. EULER U. HASSELQUIST (4)). Auch die Geschwindigkeit der Entfärbung von Methylenblau und TILLMANS-Reagens durch alkalische Glukoselösungen wird durch Phosphate, sowie durch Aminosäuren und andere Proteinspaltungsprodukte, stark verändert (V. EULER U. KLUSSMANN).

Besondere Wirkungen einzelner Anionen

Nach FISCHLER (2) soll es möglich sein, in schwach bicarbonatalkalischen Glukoselösungen die beim Kochen sonst eintretende Verharzung durch Zusatz von Na_2SO_3

hintanzuhalten, da Sulfit die Spaltprodukte fixiere. SCHADE berichtet, er habe schwach alkalische Glukoselösungen mit Hilfe von Natriumbisulfit oder Cyankalium bei mittleren Temperaturen sogar farblos erhalten können; nach seiner Meinung und nach BUCHNER, MEISENHEIMER U. SCHADE binden diese Reagenzien die Aldehydgruppen der Spaltstücke (z.B. des Glyzerinaldehyds), so daß eine Polymerisation zu dem Farbstoff nicht eintreten kann. MEISENHEIMER fand dagegen unter seinen Versuchsbedingungen (monatelange Einwirkung eines Überschusses von Natronlauge im Dunkeln), daß die Glukoselösungen weder mit Na_2SO_3 noch mit KCN farblos blieben.

Nach unseren EIGENEN BEOBACHTUNGEN läßt sich beim Kochen alkalischer Glukoselösungen die Gelbfärbung durch Zusatz von KCN nicht verhindern.

5) Temperatur

Erhöhung der Temperatur steigert die Reaktionsgeschwindigkeit und bei niedrigen Alkalikonzentrationen das Ausmaß des Zuckerabbaus. Führt man die Versuche mit größeren Alkalimengen bis zum natürlichen Reaktionsstillstand fort, so ist bei hohen Temperaturen die Harzmenge größer, die Milchsäuremenge etwas geringer als bei niedrigen (WINDISCH, KOLBACH U. RUCKDESCHEL; EVANS U. MITARB. (1,2,4); SHAFFER U. FRIEDEMANN). Das durchschnittliche Aequivalentgewicht der Restprodukte am Schluß der Reaktion sinkt mit steigender Temperatur (WINDISCH, KOLBACH U. RUCKDESCHEL). FISCHLER, TAUFEL U. SOUCI fanden, daß bei gleichbleibender Reaktionszeit die Gesamtmenge an Säuren zwischen 140 und 150° ein Maximum erreichte und bei noch höheren Temperaturen wieder absank. Bei der Oxydation von Glukose in alkalischer Lösung nimmt der Oxydationsgrad der Reaktionsprodukte mit steigender Temperatur zu (EVANS U. MITARB. (1,2,3)).

6) Versuchsdauer

Das Fortschreiten des alkalischen Glukose-Abbaus mit der Zeit haben FISCHLER, TAUFEL U. SOUCI sowie WINDISCH, KOLBACH U. RUCKDESCHEL messend verfolgt. Die letztgenannten Autoren fanden, daß der Verbrauch an Natronlauge auch nach Beendigung der Milchsäurebildung zunächst noch weitergeht unter gleichzeitiger Verminderung der Harzmenge. Sie nehmen deshalb an, daß die Harze unter dem Einfluß der überschüssigen Natronlauge noch weiter verändert und in schwache Säuren überführt werden. Auch diese Reaktion kommt schließlich zum Stillstand.

7) Bestrahlung

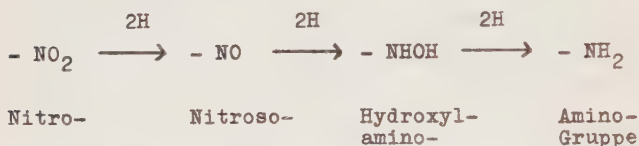
Der Zuckerabbau in alkalischer Glukoselösung wird auch durch Bestrahlung mit Sonnenlicht und insbesondere mit Ultraviolett-Licht gefördert. Angaben über die hierbei auftretenden Veränderungen finden sich bei BUCHNER U. MEISENHEIMER; DUCLAUX; MAYER; LAURENT U. WERTHEIM.

d) Die Einwirkung alkalischer Glukoselösungen auf aromatische Nitrokörper

Infolge ihrer starken Reduktionskraft sind alkalische Glukoselösungen in der Lage, zahlreiche Substanzen chemisch zu verändern. U. a. bewirken sie auch bei aromatischen Nitroverbindungen Reduktionen verschiedenen Grades. Es muß damit gerechnet werden, daß sie auch auf p-Nitrophenol-Natrium in analoger Weise einwirken können, eine Möglichkeit, die im Hinblick auf die Fragestellung dieser Arbeit hier besonders interessiert. Deshalb soll der Sonderfall der Reaktion alkalischer Glukoselösungen mit aromatischen Nitroverbindungen im folgenden Abschnitt näher besprochen werden.

1) Reduktion der Nitrogruppe

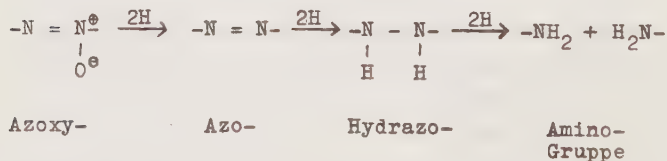
Die Reduktion der Nitrogruppe aromatischer Verbindungen mit beliebigen Reduktionsmitteln führt bei energischer Reduktion zur Aminogruppe. Bei Anwendung schonender Reagentien, besonders mit Hilfe der gut steuerbaren elektrolytischen Reduktion, konnte man Zwischenstufen isolieren, welche auf folgenden Reaktionsablauf hinweisen:



Die Gruppen $-\text{NO}$ und $-\text{NHOH}$ sind sehr reaktionsfähig und kondensieren miteinander unter dem katalytischen Einfluß von Alkali zur Azoxy-Gruppe:



Hieraus entstehen bei der weiteren stufenweisen Reduktion schließlich 2 Aminogruppen (FIESER U. FIESER):



Verwendet man als Reduktionsmittel alkalische Glukose-lösungen, so sind grundsätzlich dieselben Reaktionsprodukte zu erwarten, wobei der Reduktionsgrad der betreffenden Nitroverbindungen von deren Reaktionsfähigkeit und von anderen Bedingungen, wie Mengenverhältnissen, Alkalikonzentration, Temperatur, Einwirkungs-

zeit usw., abhängig ist. Die Reduktion aromatischer Nitrokörper durch alkalische Glukoselösungen findet bei der colorimetrischen Bestimmung der Glukose und (seltener) bei der technischen Darstellung einzelner Reduktionsprodukte praktische Anwendung.

α) Colorimetrische Bestimmung der Glukose

Viele Reduktionsprodukte aromatischer Nitroverbindungen bilden Alkalisalze, welche in wäßriger Lösung eine leuchtende Farbe besitzen. Auf diese Weise kann man auch ihre Menge colorimetrisch bestimmen. Deshalb sind die entsprechenden aromatischen Nitrokörper geeignet, als Reagentien für die colorimetrische Bestimmung der Glukose zu dienen. Andere reduzierende Zucker ergeben dieselben Farbreaktionen, zeigen jedoch ein für die jeweiligen Bedingungen charakteristisches, für jede Zuckerart spezifisches Reduktionsvermögen. Mit besonderer Leichtigkeit reagiert Fructose.

Eine Zusammenstellung der Reagentien dieser Gruppe mit Literaturübersicht findet man bei PLOETZ. Für alle gilt, daß sie nicht nur auf Glukose ansprechen, sondern auch auf andere reduzierende Substanzen. Bei der Untersuchung biologischer Flüssigkeiten (Filtrate von Blut und Liquor; Harn) muß man deshalb Kreatinin, Kreatin, Glukuronsäure, Harnsäure, Glutathion, Phenole, Aceton u.a. durch geeignete Maßnahmen vorher entfernen, wenn man nicht gänzlich falsche Ergebnisse in Kauf nehmen will.

Das gebräuchlichste Glukose-Reagens aus der aromatischen Nitroreihe ist die Pikrin-Säure, für deren Anwendung - insbesondere zur Blutzuckerbestimmung - zahlreiche Methoden ausgearbeitet wurden. Werden Pikrinsäurelösungen in Gegenwart von Glukose und Alkali erhitzt, so entsteht Pikraminsäure (Aminodinitrophenol), welche in alkalischer Lösung rot gefärbt ist. Es ist zu vermuten, daß sich dabei außerdem, wie in alkali-

schen reinen Glukoselösungen, auch aus Abbauprodukten der Glukose gelb oder braun gefärbte Substanzen bilden und daß diese für das Zustandekommen der entstehenden rotbraunen Farbe mit verantwortlich sind. Jedenfalls ist die Farbintensität der Lösungen nicht proportional dem Glukosegehalt, sondern zeigt einen kurvenförmigen Verlauf (PEARCE; BECHER u. HERRMANN; KAUFMANN (1); CRECELIUS u. SEIFERT). Die Ermittlung der Glukosewerte erfolgt deshalb mit Hilfe von Eichkurven (GIANNETTASIO), Tabellen (WILLAMAN u. DAVISON), empirisch geeichten Farbkeilen (KAUFMANN (1,2); CRECELIUS u. SEIFERT) oder möglichst fein abgestuften Farbmustern, die jeweils einem bestimmten Glukosegehalt entsprechen (KAUFMANN (3); GARDNER, BERMAN, McLACHLAN u. TERRY). Unter gleichen Bedingungen hergestellte Vergleichslösungen mit bekanntem Glukosegehalt erleiden in den ersten Tagen einen erheblichen Farbverlust (KAUFMANN (3)), ähnlich wie die mit Alkali behandelten reinen Glukoselösungen. Deshalb verwenden manche Autoren für den colorimetrischen Vergleich eine Glukoselösung ähnlicher Konzentration, die sie zugleich mit der zu untersuchenden Probe mit Pikrinsäure und Alkali kochen (THOMAS u. DUTCHER; BENEDICT u. OSTERBERG; LEI PAREDES; SCHACHKELDIAN; LEWIS u. BENEDICT; BENEDICT (2)). Beständige Standardlösungen von Pikramat (BENEDICT u. OSTERBERG; HILLER; MYERS u. BAILEY; PEARCE; LEWIS u. BENEDICT; BENEDICT (2)) oder von Kaliumdichromat (BECHER u. HERRMANN; BENEDICT (2)) haben demgegenüber den Nachteil, daß sie der mit zunehmender Glukosekonzentration abnehmenden Gelbfärbung durch unverbrauchte Pikrinsäure nicht Rechnung tragen, ein Fehler, welcher durch Verwendung von Farb-Doppelkeilen mit getrennten Schichten von Pikrat und Pikramat (KAUFMANN (1,2); CRECELIUS u. SEIFERT) vermieden werden kann. Eine weitere Fehlerquelle der Pikrinsäuremethoden besteht darin, daß Gemische von Pikrinsäure

und Alkali sich schon von selbst rötlich färben (GUILLAUME-GENTIL).

Bei Umkehr der Konzentrationsverhältnisse kann mit Hilfe von Glukose und Alkali Pikrinsäure bestimmt werden. Die Reduktion der Pikrinsäure bleibt hierbei nicht bei der Pikraminsäure stehen; gleichzeitig färbt sich unter den Bedingungen der Reaktion die Glukoselösung ebenfalls gelb, weshalb nach empirischen Eichkurven gemessen werden muß (STÖHR u. SCHEIBL).

Andere Verfahren beruhen darauf, daß o- und p-Dinitrobenzol sowie 3,4-Dinitrobenzoesäure ganz allgemein durch Reduktone, und zwar auch schon in der Kälte, zu den entsprechenden Hydroxylaminoverbindungen reduziert werden. (V. EULER u. EISTERT). Es entsteht hierbei das unbeständige o-Nitrophenyl-Hydroxylamin (Alkalisalze intensiv violett) bzw. p-Nitrophenyl-Hydroxylamin, dessen Salze lebhaft kirschrot gefärbt sind (KUHN u. WEYGAND; FEARON u. KAWERAU; PÉRONNET u. HUGONNET; BOSE), während man mit 3,4-Dinitrobenzoesäure die ebenfalls leuchtend violetten Salze der 3-Nitro-4-Hydroxylaminobenzoessäure erhält (WEYGAND u. HOFMANN; WEYGAND). Erhitzt man Glukose mit 3,4 Dinitrobenzoesäure und Alkali, so entsteht anfangs ebenfalls die Hydroxylaminoverbindung, bei fortschreitender Reaktion jedoch in zunehmendem Maße 3-Nitro-4-Aminobenzoessäure (BOREL u. DEUEL).

Weitere zur Glukosebestimmung geeignete aromatische Nitrokörper sind: m-Dinitrobenzol (CHAVASSIEU u. MOREL); 2,4-Dinitrophenol (POE u. EDSON); 3,5-Dinitrosalicylsäure, welche zu der tiefroten 3-Amino-5-Nitrosalicylsäure reduziert wird (SUMNER u. GRAHAM; SUMNER u. NOBACK; HOSTETTLER, BOREL u. DEUEL); ein Reagens aus 3,5-Dinitrosalicylsäure und Phenol (SUMNER; BOREL, HOSTETTLER u. DEUEL); o-Nitrophenylpropiolsäure, die hierbei Indigo liefert (PEYER; ARNOLD u. BEHRENS; RUINI;

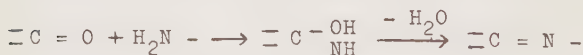
JOLLES (1); BAYER; QUIRINI; HOPPE-SEYLER (1)); und 2,7-Dioxy-3,6-Dinitrofluoran, woraus das entsprechende Diaminofluoran entsteht, dessen Na-Salz kirschrot gefärbt ist (DOMINIKIEWICZ).

B) Technische Darstellung einzelner Reduktionsprodukte

Heiße alkalische Traubenzuckerlösungen werden auch in der chemischen Industrie als Reduktionsmittel angewendet. Man erreicht damit Reduktion von Nitroalizarinblau zu Aminoalizarinblau (FARBWERKE HOECHST) und von 2-Nitroanthrachinon zu 2-Hydroxylaminoanthrachinon (SCHOLL u. EBERLE), die Umwandlung von 1,2,4-Nitrotoluidin in Diaminoazoxytoluol (Jansen) und die Bildung eines schwarzen oder eines blauvioletten Farbstoffes aus 1,4-Dinitronaphthalin (BAD. ANILIN- u. SODAFABRIK).

2) Sekundäre Reaktionen

Im vorhergehenden Abschnitt wurde gezeigt, daß heiße alkalische Glukoselösungen aromatische Nitrokörper zu Aminoverbindungen zu reduzieren vermögen. Nun haben Amine die Fähigkeit, mit Aldehyden und Ketonen zu kondensieren unter Bildung ungesättigter, stickstoffhaltiger Derivate; die Reaktionen verlaufen in der Wärme leicht. Primär entstehen dabei wahrscheinlich Additionsprodukte, aus welchen dann Wasser abgespalten wird:



Alle derartigen Kondensationen sind umkehrbar; durch Kochen mit verdünnten Mineralsäuren können die meisten der so entstandenen Verbindungen wieder gespalten werden. Die Kondensationsprodukte aus Aldehyden und aromatischen Aminen werden als SCHIFF'sche Basen bezeichnet (FIESER u. FIESER).

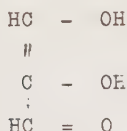
Der Begriff der SCHIFF'schen Base, der ursprünglich nur die Kondensationsprodukte zwischen aromatischen Aldehyden und aromatischen primären Aminen umfaßte, hat im Laufe der Zeit Erweiterungen erfahren und man versteht darunter heute ganz allgemein Verbindungen aus Aminen und Aldehyden oder Ketonen - Stoffe, die hinsichtlich ihrer Entstehungsart und ihrer Stabilität sehr große Unterschiede aufweisen. V. EULER, HASSELQUIST U. CEDER haben für verschiedene derartige Verbindungen die Abhängigkeit ihrer Hydrolyse von der Wasserstoffionen-Konzentration untersucht. Sie bringen auch einen Literaturüberblick. Auch unter den SCHIFF'schen Basen im engeren Sinne gibt es solche, die - im Widerspruch zu der oben zitierten Grundregel (FIESER U. FIESER) - bei alkalischer Reaktion gespalten werden, während sie in saurer Lösung stabil sind.

Glukose ist chemisch ein Polyhydroxy-Aldehyd. Auch viele Derivate, die im alkalischen Medium aus ihr entstehen, besitzen Aldehyd- oder Ketongruppen. So erscheint es theoretisch möglich, daß die bei der Reduktion aromatischer Nitroverbindungen primär entstehenden Amine in den heißen alkalischen Glukoselösungen sekundär gebunden werden unter Bildung SCHIFF'scher Basen.

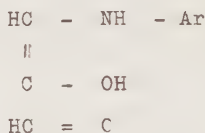
Schon SCHIFF beschrieb eine dunkelgelbe, glasartige Substanz, die aus 1 Mol Glukose und 1 Mol Anilin unter Wasseraustritt entsteht, wenn beide Stoffe gemeinsam erhitzt werden. Sie wird schon bei ganz schwach saurer Reaktion ($\text{pH} = 5,6$) schnell hydrolysiert und ist auch in wäßriger Lösung unbeständig; bei $\text{pH} 12,8$ erfolgt die Spaltung wesentlich langsamer (V. EULER, HASSELQUIST U. CEDER (2)). Eine analoge Verbindung entsteht aus Glukose und Toluidin.

Für ein Zwischenprodukt des alkalischen Glukoseabbaus, nämlich für das Triose-Redukton, werden bei V. EULER U. EISTERT Umsetzungen mit aromatischen Aminen, z.B. mit p-Aminobenzoesäure, beschrieben; dort auch Litera-

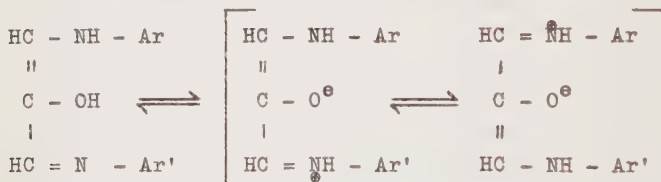
tur. Bei Anwendung einer aequimolekularen Menge eines primären Amins in schwach saurem Medium reagiert die endständige, saure Enolgruppe des Triosereduktions in der Kälte mit der Aminogruppe unter Bildung eines Monoanils. Mit 2 Mol primärer Amine und mit überschüssiger Säure tritt in der Wärme zusätzlich auch an der Aldehydgruppe Reaktion ein und man erhält Dianilsalze, aus welchen die freie Dianil-Base gewonnen werden kann. Ebenso wie das Triosereduktion selbst, bilden auch seine Anile, vor allem die Dianile, mehrere tautomere bzw. mesomere Formen:



Triose-Reduktion



Monoanil des Triose-Reduktions



Dianil des Triose-Reduktions

Ein Anhalt für die Möglichkeit analoger Reaktionen des Triose-Reduktions in alkalischen Milieu, z.B. in alkalischer Glukoselösung, findet sich bei V. EULER U. EISTERT nicht.

Sonst fanden wir lediglich bei LIGETT U. DEITZ die Anmerkung, daß stickstoffhaltige Gruppen durch eine der typischen Carbonylreaktionen möglicherweise zu Bestandteilen von Zuckerfarbstoffen werden können (vergl. auch KRÖNER U. KOTHE)

II. GEFÄRBTE SUBSTANZEN, DIE BEI ALKALISCHER REAKTION AUS GLUKOSE ENTSTEHEN

Versetzt man die Lösung eines reduzierenden Zuckers mit etwa einem Viertel ihres Volumens an starker Kali- oder Natronlauge und erwärmt, so wird die Lösung zuerst gelb, dann orange, darauf gelbbraun und zuletzt dunkelbraun. Sie riecht gleichzeitig auch schwach nach Caramel, ein Geruch, der beim Ansäuern noch stärker wird (BRIGL U. PLOETZ). Die Reaktion ist als MOORE'sche Probe bekannt und stellt einen der ältesten und einfachsten Nachweise für reduzierende Zucker dar. MOORE U. HELLER, BENDIX U. SCHITTENHEIM sowie RUDECK und auch ALTHAUSEN haben Verfahren ausgearbeitet, nach denen man mit Hilfe dieses Verhaltens Glukose im Harn colorimetrisch bestimmen kann. Die Methoden haben sich jedoch nicht durchgesetzt, da sie sehr unzuverlässig sind. Nach GUILLAUME-GENTIL färbt sich auch normaler Harn beim Erhitzen mit Alkali braun, und nach Aufnahme vieler Medikamente treten ähnliche Farbreaktionen in den mit Alkali versetzten, zuckerfreien Harnen schon in der Kälte auf. Auch SCHWERT U. SCHMIDT beobachteten, daß in normalen Harnen wechselnde Mengen xanthochromer Substanzen vorhanden sind, deren Farbe sich durch Kochen mit Natronlauge zu goldgelben Tönen intensivieren läßt.

Nicht nur beim Erwärmen mit starken Alkalien, sondern auch bei mäßig alkalischer Reaktion, oft schon in der Kälte, entwickelt sich in den Glukoselösungen eine gelbe bis braune Farbe. Die sie verursachenden gefärbten Substanzen werden in der Literatur als undefinierte Farbstoffe (BERL U. FEAZEL (2): "sugar chromogen"; LIGETT U. DEITZ: "colorant"), rotbraune Farbstoffschmierer, Caramelle (FISCHLER (2)), Harze (NEF (4); WINDISCH, KOLBACH U. RUCKDESCHEL), Teere (EVANS) beschrieben. Wegen der unbekannten Natur dieser Stoffe ist es nicht möglich, alle Umsetzungen in alkalischen Glukoselösungen genau zu verfolgen. Bei technischen Prozessen, z.B. bei der Darstellung von Milchsäure durch alkalischen Abbau von Glukose treten sie als unerwünschte

Nebenprodukte auf, welche die Ausbeute verringern und die Reinigung erschweren. Forschung und chemische Industrie sind deshalb in gleicher Weise interessiert und bemüht, Entstehungsbedingungen und Natur dieser gefärbten Substanzen aufzuklären; vorläufig gelangte man aber nur zu einem sehr beschränkten Einblick. In den folgenden Kapiteln sei ein kurzer Überblick über die bisher gewonnenen Erkenntnisse gegeben.

a) Der Einfluß der Reaktionsbedingungen auf die Farbstoffbildung

Wie die Bildung der übrigen Reaktionsprodukte, so hängt auch die Entstehung des alkalischen Glukosefarbstoffes von vielen Faktoren ab:

1) Wasserstoffionen-Konzentration:

Unter ganz schwacher Alkalieinwirkung, wobei es nur zu Isomerisierungen kommt, bleiben die Glukoselösungen wasserhell. Farbe entwickelt sich erst unter Bedingungen, welche bereits Molekülsplaltungen bewirken.

KRÖNER u. KOTHE prüften beim Erhitzen von Glukoselösungen die Abhängigkeit der Farbstoff-Entwicklung von der Wasserstoffionen-Konzentration. Die Absorption der Lösungen, gemessen bei pH-Werten zwischen 1 und 5, war dann am geringsten, wenn der pH-Wert beim Erhitzen etwa 2,7 betragen hatte. Die Lage des Minimums der Farbstoffbildung erwies sich als vom Einfluß des Luftsauerstoffes unabhängig. Die Farbintensität stieg bei noch stärkeren Säuregraden steil, mit abnehmender Wasserstoffionen-Konzentration dagegen wesentlich langsamer an.

Werden die Versuche bis zum Stillstand der Reaktion ausgedehnt und die Farbstoffmengen durch Titration mit KMnO_4 bestimmt, so erhält man bei schwach alkalischer Reaktion, z.B. mit verdünnter NaOH oder mit Soda, wesentlich größere Mengen in Aether löslicher, gefärbter

Harze als bei hohen Alkalikonzentrationen (WINDISCH, KOLBACH U. RUCKDESCHEL).

EIGENE VERSUCHE mit 0,2-prozentiger Glukoselösung unter Zusatz unterschiedlicher NaOH-Mengen ergaben, daß die nach fünf Minuten Kochen im Wasserbad meßbare Farbintensität, bestimmt mit dem Dubosq-Colorimeter, bei mäßiger Alkalikonzentration ein Maximum erreichte; bei niedrigeren oder höheren NaOH-Konzentrationen war sie geringer. Die Absorptionskurven der fünf Minuten lang mit NaOH gekochten Glukoselösungen zeigten bei Veränderung der Alkalikonzentration Unterschiede in der Lage der Maxima und Minima und in der Stärke der Absorption (Abb. 3 und 4; S. 60).

Es sei hier erwähnt, daß bei hohen Temperaturen sich auch in sauren und sogar in neutralen Lösungen von Glukose und erst recht von Fructose eine braune Farbe entwickelt, die offenbar weitgehende Ähnlichkeit mit der durch Alkali-Einwirkung entstehenden aufweist. Sie wird aber, im Gegensatz zu jener, auf die Gegenwart von gefärbten Furanderivaten zurückgeführt, insbesondere auf 5-Hydroxymethyl-2-Furaldehyd und seine Umwandlungs- und Polymerisationsprodukte. In Zucker-Rohprodukten können, je nach der Art der vorausgegangenen Prozesse, beide Arten gefärbter Substanzen als Verunreinigungen vorkommen (LIGETT U. DEITZ; KRÖNER U. KOTHE).

2) Temperatur:

Versuche mit KOH bzw. NaOH bei Temperaturen zwischen 25 und 60° ergaben, daß bei Erhöhung der Temperatur die Menge der gebildeten gefärbten Substanzen wächst auf Kosten der Ausbeute an Milchsäure (FRAMM; EVANS U. MITARB. (1,2,6); WINDISCH, KOLBACH U. RUCKDESCHEL).

3) Reaktionszeit:

Wie schon angedeutet, wechseln sowohl Charakter als auch Intensität der Farbe alkalischer Glukoselösungen im Verlauf der Reaktion mit der Zeit. Der Farbton ist zuerst goldgelb, dann orange; er wird darauf rotbraun, dann braun und zuletzt dunkelbraun, unter Umständen sogar schwärzlich. Gleichzeitig werden die Lösungen zunehmend trüb.

WINDISCH, KOLBACH U. RUCKDESCHEL bestimmten die während der Milchsäurebildung entstehenden Mengen aetherlöslicher Harze quantitativ durch Titration mit KMnO_4 , wobei sie die zur oxydativen Entfärbung des Harzes benötigten Mengen an $n/40 \text{ KMnO}_4$ als Maßstab benutzen. Die so erfaßbare Harzmenge erreicht etwa gleichzeitig mit dem Ende der Milchsäureproduktion oder kurz vorher ebenfalls ein Maximum. Unter dem Einfluß überschüssigen Alkalis nimmt sie danach wieder ab. Es entstehen dabei unter weiterem Alkaliverbrauch niedrig molekulare, saure Endprodukte. Auch dieser Vorgang kommt schließlich zum Stillstand. In Übereinstimmung damit fanden BUCHNER U. MEISENHEIMER in einer 5 % KOH enthaltenden Glukoselösung eine vorübergehende Bräunung. Die Färbung stellte sich bei gewöhnlicher Temperatur nach einigen Tagen ein und verschwand nach mehreren Wochen wieder. Der Versuch wurde jedoch nicht unter strengem Luftabschluß durchgeführt und es muß deshalb an oxydative Einflüsse gedacht werden. Nach DUCLAUX verschwindet aber die Bräunung in alkalischen, dem Sonnenlicht ausgesetzten Glukoselösungen auch unter Luftabschluß nach einiger Zeit, wenn genügend Alkali vorhanden ist.

Die Farbstoffbildung beim Erhitzen einer neutralen Invertzuckerlösung (vergl. S. 39) in Abhängigkeit von der Zeit haben DOSS U. GHOSH gemessen. Die Höhe der Absorption war der Reaktionszeit nicht proportional, vielmehr nahm die Rate der Farbentwicklung mit der Zeit zu. Daraus läßt sich schließen, daß zunächst intermediäre Abbaupro-

dukte entstehen, die sich dann zu Farbstoffen zusammenlagern.

Unsere EIGENEN VERSUCHE wurden ebenfalls unter Luftzutritt durchgeführt. Dabei zeigte es sich, daß die nach 5 Minuten Kochen entwickelte rötlich-bräunliche Farbe der alkalischen Glukoselösungen sich im Lauf der nächsten Stunden weiter veränderte, wenn die Reagensgläser bei gewöhnlicher Temperatur und im zerstreuten Tageslicht stehen blieben. Unter gleichzeitiger geringer Zunahme einer zunächst sehr zarten Trübung verblaßte die Farbe zu einem sehr hellen, gelblich-bräunlichen Ton, der einen orangefarbenen Schimmer nicht mehr besaß. Es ist anzunehmen, daß mit dieser Erscheinung auch eine langsame Änderung der Lichtdurchlässigkeit einhergeht. Deshalb haben wir bei unseren Versuchen die glukosehaltigen alkalischen Lösungen stets genau 5 Minuten lang im Wasserbad gekocht, dann mit Leitungswasser abgekühlt und sofort photometrisch untersucht.

4) Glukosekonzentration

Werden saure Glukoselösungen erhitzt, so ist die Intensität der entwickelten braunen Farbe der Glukosekonzentration nicht streng proportional. Dies soll darauf beruhen, daß die Wasserstoffionen-Konzentration verdünnter Mineralsäuren durch den Glukosezusatz geringgradig erhöht wird (KRÖNER U. KOTHE).

In EIGENEN VERSUCHEN haben wir geprüft, ob in alkalischen Lösungen eine gesetzmäßige Beziehung besteht zwischen Glukosekonzentration und Farbintensität. Die Messungen wurden mit dem DUBOSQ-Colorimeter unter Vorschaltung eines Blaufilters vorgenommen. Die untersuchten Lösungen enthielten Glukosemengen zwischen 50 und 200 mg % und konstante Mengen NaOH (2 Tropfen verd. NaOH/5 ml Lösung). Sie wurden 5 Minuten im Wasserbad gekocht und dann sofort mit Leitungswasser ge-

kühlt. Als Vergleichslösung verwendeten wir eine Glukoselösung mittlerer Konzentration (100 mg %), welche bei gleichem Alkalizusatz gleichzeitig mit der zu untersuchenden Lösung gekocht wurde. Auf diese Weise gelang es, Fehler auszuschalten, die bei Verwendung einer festen Vergleichslösung durch die Veränderung des Glukosefarbstoffes mit der Zeit hätten auftreten können.

Ergebnis: Zwischen Glukosekonzentration und Farbinintensität besteht keine strenge Proportionalität im Sinne des BEER'schen Gesetzes. Die Zu- und Abnahme der Farbstärke mit steigenden bzw. sinkenden Glukosemengen ist wesentlich größer, als der Glukosekonzentration entspricht.

Unsere Versuche wurden mit verschiedenen Glukosemengen, aber gleichbleibendem Alkalizusatz durchgeführt. Es hat sich dabei also außer der Glukosekonzentration auch das molare Verhältnis zwischen Glukose und NaOH geändert, welches, wie früher ausgeführt, von wesentlichem Einfluß auf den Verlauf des alkalischen Glukoseabbaus ist. Es wäre möglich, daß die beschriebene Abweichung vom BEER'schen Gesetz durch die Veränderung dieses molaren Verhältnisses bedingt war.

Im Anschluß daran haben wir auch untersucht, ob die Anwesenheit von Trichloressigsäure die Gelbfärbung alkalischer Glukoselösungen und deren Abhängigkeit von der Glukosekonzentration beeinflusst. Zu diesem Zweck wurden Lösungen mit einem Glukosegehalt zwischen 40 und 160 mg % im Verhältnis 1 : 1 mit 20 %iger Trichloressigsäure verdünnt und alle Proben gleichmäßig mit soviel NaOH versetzt, wie nötig war, um die Trichloressigsäure zu neutralisieren und eine mäßig alkalische Reaktion herzustellen. Nach dem Mischen wurden die Proben 5 Minuten lang im Wasserbad gekocht, wobei sich in den Lösungen zahlreiche Gasbläschen und ein deutlicher

Geruch nach Chloroform entwickelten. Da die Gasbläschen die Ablesung im Colorimeter beeinträchtigten, mußte nach dem Kochen filtriert werden; sie verschwanden dabei unter Aufbrausen restlos. Bei den colorimetrischen Untersuchungen diente wieder die Lösung mit 100 mg % Glukose als Vergleich.

Ergebnis: Auch in Gegenwart von Trichloressigsäure färben sich alkalische Glukoselösungen beim Kochen gelb bis braun. Die nach 5 Minuten Kochen entwickelte Färbung entspricht im Ton derjenigen, die unter gleichen Bedingungen in Trichloressigsäure-freien Lösungen entsteht, ist jedoch der Verdünnung entsprechend geringeren Grades. Genau wie ohne Trichloressigsäure-zusatz ist bei Änderung der Glukosekonzentration die Zu- und Abnahme der Farbtintensität größer, als es den Änderungen der Glukosekonzentration entspricht.

5) Oxydationsmittel

Durch Zusatz starker Oxydationsmittel, wie z.B. H_2O_2 , kann die Gelbfärbung alkalischer Glukoselösungen unterdrückt werden (SCHADE); bei Temperaturen bis zu ca. 45° genügt schon die Durchströmung mit Luftsauerstoff, um die Lösungen farblos zu erhalten (FRAMM). Unter der Einwirkung von Oxydantien bleibt zugleich mit der Gelbfärbung auch die Bildung von Milchsäure aus. (Vergl. auch HOPPE-SEYLER (1)). Man erhält stattdessen, in Abhängigkeit von den Versuchsbedingungen, verschiedenartige Oxydationsprodukte (vergl. S. 20).

Mit Hilfe starker Oxydationsmittel ist es auch möglich, die bereits gebildeten Harze zu zerstören. Die bis zur völligen Entfärbung der Lösungen verbrauchte Menge $n/40 \text{ KMnO}_4$ benutzten WINDISCH, KOLBACH U. RUCKDESCHEL als Maß für die oxydierten Harzmengen.

Wir haben in EIGENEN VERSUCHEN geprüft, ob ein Zusammenhang besteht zwischen der Glukosekonzentration und der Menge an Wasserstoffsuperoxyd, welche notwendig ist, um die Lösungen farblos zu erhalten, und ob Trichloressigsäure hierauf einen Einfluß ausübt.

1) Je 6 ml Glukoselösung in Konzentrationen zwischen 25 und 300 mg %, wurden mit je 1 Tropfen konz. NaOH und 1 Tropfen Perhydrol versetzt und, zugleich mit ebenso zusammengesetzten, aber Wasserstoffsuperoxyd-freien Vergleichslösungen, 5 Minuten lang im Wasserbad gekocht. Die entstandene rötlich-bräunliche Färbung war in den Proben mit H_2O_2 durchwegs etwas geringer als in den Vergleichsproben; bei 25 mg % fehlte sie ganz, während die Vergleichslösung noch schwach gefärbt war.

2) Je 3 ml Glukoselösung (25 bis 300 mg %) + 8 Tropfen konz. NaOH + 1 Tropfen Perhydrol + 3 ml 20 %iger Trichloressigsäurelösung wurden ebenfalls 5 Minuten lang im Wasserbad gekocht. Die Proben mit 25 und 50 mg % Glukose blieben farblos, in den übrigen zeigte sich eine mit der Glukosekonzentration ansteigende Färbung, die aber deutlich schwächer war als bei 1).

3) Je 3 ml Glukoselösung 300 mg %ig + 3 ml 20 %iger Trichloressigsäurelösung + 8 Tropfen konz. NaOH wurden mit Perhydrolmengen zwischen 0 und 5 Tropfen versetzt und 5 Minuten lang im Wasserbad gekocht. Die entstandene rötlich-bräunliche Färbung nahm mit steigender Tropfenzahl Perhydrol ab; die Probe mit 5 Tropfen Perhydrol blieb farblos.

Aus den Versuchen ergab sich also, daß die Wasserstoffsuperoxyd-Menge, die erforderlich ist, um die Glukoselösungen farblos zu erhalten, allein von der anwesenden Glukosemenge abhängig ist. Bei Zusatz von Trichloressigsäure waren die Ergebnisse analog.

6) Andere Möglichkeiten, die Farbstoffbildung zu unterdrücken:

In der Literatur werden verschiedene Reagentien beschrieben, mit deren Hilfe es möglich sein soll, die Harzbildung beim alkalischen Glukoseabbau zu verhindern. FISCHLER setzte den siedenden, sehr schwach bicarbonatalkalischen Glukoselösungen Natriumsulfit zu und konnte sie dadurch zunächst farblos, später gelb erhalten. NaHSO₃, KCN und Ammoniak sollen nach SCHADE eine ähnliche Wirkung entfalten. Bei Versuchen mit stark alkalischen Glukoselösungen, die monatelang im Dunkeln stehen blieben, gelang es MEISENHEIMER jedoch nicht, einen wesentlichen Einfluß zugesetzten Sulfits oder Cyanids auf die Farbstoffbildung nachzuweisen. Die intensive Schwärzung, welche sonst entsteht, wenn in der Siedehitze und bei nur geringem Wasserzusatz NaOH auf Traubenzucker einwirkt, konnte HOPPE-SEYLER (1) durch reichlichen Zusatz von Magnesia verhindern; es wurde dann aber auch keine Milchsäure gebildet. Es dürfte sich hierbei um eine Oxydationswirkung gehandelt haben (vergl. S. 43).

Bei der Nachprüfung fanden WIR, daß sich NaOH-haltige Glukoselösungen beim Kochen auch durch KCN nicht farblos erhalten lassen. Wurde NaOH durch Ammoniak ersetzt, so wurden die Proben beim Kochen ebenfalls langsam gelb. Setzte man jedoch einer natronalkalischen Glukoselösung zusätzlich viel konzentrierte Ammoniaklösung zu und erwärmte dann, so entwickelte die Gelbfärbung sich wesentlich langsamer und blieb viel geringeren Grades als in einer Vergleichsprobe ohne Ammoniak; erst als der Ammoniakgeruch verschwunden war, verlief die Farbstoffbildung in der gewohnten Weise weiter (vergl. S. 25/26).

Nach SCHADE soll angeblich auch eine Erniedrigung des Druckes oder das Durchströmen der Lösungen mit indifferenten Gasen, z.B. mit H₂, die Harzbildung verhindern. Es soll dadurch das Farbstoff-Monomere aus der Lösung entweichen.

b) Die Entstehung der Farbstoffe

Alle Umstände deuten darauf hin, daß die gefärbten Substanzen sich aus Spaltprodukten bilden, die beim alkalischen Glukoseabbau primär entstehen. Ein Zusammenhang mit der Milchsäurebildung ergibt sich aus folgenden Beobachtungen:

- 1) Durch Variation der Versuchsbedingungen gelingt es, entweder an Milchsäure oder an Harzen maximale Ausbeuten zu erzielen, niemals an beiden zugleich (EVANS U. MITARB. (1,2,6); WINDISCH, KOLBACH U. RUCKDESCHEL).
- 2) Bei der Einwirkung von Oxydationsmitteln bleibt sowohl die Farbstoffentwicklung als auch die Milchsäurebildung aus (FRAMM; BUCHNER, WEISENHEIMER U. SCHADE).

Man sprach deshalb schon frühzeitig die Vermutung aus, daß Harze und Milchsäure sich aus einer gemeinsamen, sehr reaktionsfähigen Vorstufe bilden (BUCHNER, WEISENHEIMER U. SCHADE).

Von den aus schwach alkalischen Glukoselösungen isolierten labilen Reaktionsprodukten wurden insbesondere die Triosen bzw. das aus ihnen entstehende Methylglyoxal (FISCHLER, HAUSS U. TÄUFEL; SPECK) sowie Acetol und Triose-Redukton, bzw. deren Endiol-Formen, als Farbstoffbildner angesehen (BERL U. FEAZEL (2)). Tatsächlich zeichnen alle diese C_3 -Verbindungen sich dadurch aus, daß ihre alkalischen Lösungen sich besonders leicht gelb bzw. braun färben.

- 1) In Lösungen von Glyzerinaldehyd oder Dioxyaceton entsteht bei der Einwirkung von Alkali derselbe Farbstoff, wie in Glukoselösungen. Er bildet sich aber aus Triosen, insbesondere aus Dioxyaceton, wesentlich schneller, als aus Glukose selbst (FISCHLER (2); BERL U. FEAZEL (2)). Man nimmt deshalb an, daß die beim alkalischen Glukoseabbau zunächst entstehenden Triosen die eigentliche Muttersubstanz der Farbstoffe sind.

- 2) Methylglyoxal (Brenztraubenaldehyd) ist eine gelbe, ölige Flüssigkeit (V. EULER U. EISTERT) und neigt sehr zur Polymerisation (SPOEHR U. STRAIN (2)). Polymerisiertes Methylglyoxal soll nach DENIS eine gelbe Masse darstellen, deren wäßrige Lösungen alle Reaktionen des Methylglyoxals ergeben. In sehr verdünnten, wasserhellen Methylglyoxallösungen bildet sich schon bei schwach alkalischer Reaktion in der Kälte in kurzer Zeit Caramel (FISCHLER, HAUSS U. TÄUFEL). Bei Siedetemperatur verharzen die Lösungen weitgehend (BERNHAUER U. GÖRLICH).
- 3) Verdünnte wäßrige Acetol-Lösungen werden schon durch Spuren eines alkalisch reagierenden Salzes gelb gefärbt (NEF (1)). In alkalischen Acetol-Lösungen bilden sich gelbe und braune Farbstoffe, die, auch hinsichtlich ihrer Absorptionskurven, den in alkalischen Glukoselösungen entstehenden Farbstoffen sehr ähnlich sind (BERL U. FEAZEL).
- 4) Triose-Redukton polymerisiert beim Erhitzen der alkoholischen Lösung im Bombenrohr zu einem nicht mehr reduzierenden, braunen Harz vom Molekulargewicht 126 (V. EULER, HASSELQUIST U. GLASER). Lösungen von Hydroxybrenztraubenaldehyd, welcher durch Säuren und Laugen irreversibel und nicht quantitativ in das isomere Triose-Redukton umgewandelt werden kann, sind bei alkalischer Reaktion gelb, bei saurer Reaktion farblos. Mit Hilfe von Soda ließ sich ein rotes, glasiges Natriumsalz gewinnen (NORRISCH U. GRIFFITHS). Lösungen von trimerem Hydroxybrenztraubenaldehyd, der in heißem Wasser sehr schnell, in kaltem Wasser langsam in die monomolekulare Form übergeht, waren goldgelb (EVANS U. WARING).

Die Diketogruppe, welche bei der Oxydation der Endiolgruppe primär entsteht, verleiht ihren Verbindungen eine gelbe Farbe (V. EULER U. HASSELQUIST (2)). Nach NEF (3) und EVANS U. MITARB. (1,2,5,6) entstehen Diketo-Verbindungen auch als Zwischenprodukte bei der Umlagerung der Endiolate

von Glukose und ihren Spaltstücken zu Saccharinsäuren; als Beispiel sei das Auftreten von Methylglyoxal bei der Milchsäurebildung erwähnt (vergl. S. 18).

Einen Einblick in die frühen Stadien des alkalischen Glukose-Abbaus und den Mechanismus der Farbstoffbildung erhoffte man von der Absorptions-Photometrie im UV-Bereich. Der Wunsch, die sehr labilen intermediären Reaktionsteilnehmer zu erfassen und ihre Umsetzungen zu verfolgen, veranlaßte dazu, NaOH in geringen bis höchstens mäßigen Konzentrationen, meistens im molaren Verhältnis, in der Kälte auf Glukose einwirken zu lassen. GABRYELSKI U. MARCHLEWSKI (2) haben auch ausprobiert, welche NaOH-Mengen noch eben ausreichend sind, um bei gewöhnlicher Temperatur in Glukoselösungen selektive Absorptionen zu veranlassen. Unter denselben Bedingungen wurden auch die Spaltprodukte des alkalischen Glukoseabbaus untersucht und die Ergebnisse verglichen.

Die Glukoselösungen zeigen unmittelbar nach dem Zusatz von Alkali, bei sehr geringen NaOH-Mengen erst allmählich (GABRYELSKI U. MARCHLEWSKI (2)), eine bei etwa 2400 Å beginnende Endabsorption im UV-Bereich, welche bei sofortiger Neutralisation wieder verschwindet (BERL U. FEAZEL (2)), und außerdem in den ersten Minuten ein Maximum im kurzwelligen Gebiet. Es wurde bei 2680 Å (GABRYELSKI U. MARCHLEWSKI) oder 2780 Å (PETUELY U. MEIXNER), in bei 40° gehaltenen bicarbonat- oder phosphatalkalischen Lösungen bei 2650 Å (SHOU U. WURMSER) gefunden und wird der freien Aldehydform der Glukose zugeschrieben. Sie entsteht bei Alkalizusatz aus der Aldehyd-Hydratform, die in wäßriger Lösung mit der Ringform im Gleichgewicht steht. Dieses Maximum verschwindet nach einigen Minuten, bei sehr geringen NaOH-Konzentrationen nach entsprechend längerer Zeit (GABRYELSKI U. MARCHLEWSKI (2)). Gleichzeitig entwickelt sich ein zweites Maximum bei 3100 Å (GABRYELSKI U. MARCHLEWSKI; V. EULER, HASSELQUIST U. HANSHOFF (1)) bzw. 3125 Å (PETUELY U. MEIXNER). Es rührt innerhalb der ersten Minuten allein von dem Endiolat-Monoanion der Glukose her

(V. EULER U. EISTERT) und kann so lange durch Ansäuern zum Verschwinden gebracht werden. Später sind an dieser Absorption auch die in zunehmendem Maße gebildeten aci-Reduktone beteiligt. Durch Zugabe von Säure wird jetzt lediglich eine Verschiebung des Maximums nach $2800 \text{ \AA}$ (PETUELY U. MEIXNER) erreicht. Nach längerer Reaktionsdauer unter Luftzutritt findet man das Maximum im alkalischen Medium bei $2935 \text{ \AA}$ (GABRYELSKI U. MARCHLEWSKI (1)) bzw. $2950 \text{ \AA}$ (BERL U. FEAZEL (2)). Säuert man die Lösungen an, so erscheint es unter Luftabschluß bei pH 6,5 bei $2775 \text{ \AA}$ (V. EULER U. HASSELQUIST (3)), bei stärkeren Säuregraden bei $2660 \text{ \AA}$ (V. EULER, HASSELQUIST U. HANSHOFF (1)) und unter Luftzutritt bei $2650 \text{ \AA}$ (BERL U. FEAZEL (2)). Die Verschiebung erfolgt etwa bei pH 7,5 (BERL U. FEAZEL (2)).

Dem gegenüber führte die Untersuchung der oben aufgeführten Spaltprodukte zu folgenden Ergebnissen:

- 1) Glyzerinaldehyd-Lösungen absorbieren zunächst nicht; allmählich entwickelt sich in ihnen das Absorptionsspektrum des Glukosefarbstoffes (BERL U. FEAZEL (2)).
- 2) Dioxyaceton-Lösungen zeigen eine weiche Absorption bei $2700 \text{ \AA}$ (BERL U. FEAZEL (2)) bzw. $2650 \text{ \AA}$ (LIGETT U. DEITZ).
- 3) Methylglyoxal-Lösungen besitzen bei allen pH-Werten zwischen 2 und 10 ein Absorptionsmaximum bei $2800 \text{ \AA}$ (BERL U. FEAZEL (2)) bzw. $2830 \text{ \AA}$ (LIGETT U. DEITZ).
- 4) Acetol-Lösungen haben bei pH-Werten zwischen 4 und 11 ein Absorptionsmaximum bei $2700 \text{ \AA}$, das bei pH 11,5 nach $2750 \text{ \AA}$ verschoben wird. Bei der Einwirkung von Alkali entwickelt sich der ebenfalls gelbe oder braune Acetol-Farbstoff. Eine alkalische Acetol-Lösung zeigte nach 18-stündigem Stehen bei Zimmertemperatur ein Absorptionsmaximum bei $2900 \text{ \AA}$, welches durch Säurezusatz, etwa bei pH 3, nach $2550 \text{ \AA}$ verlagert wurde (BERL U. FEAZEL (2)).

- 5) Das Absorptionsmaximum des Triose-Reduktions wurde in gepufferten wäßrigen Lösungen bei folgenden Wellenlängen gefunden:

pH	1,8	2660 Å
pH	6,0	2670 Å
pH	11,1	2900 Å
pH	13,5	3140 Å

(V. EULER U. EISTERT). Nach BERL U. FEAZEL liegt es bei pH-Werten zwischen 2 und 3,5 bei 2650 Å und wird zwischen pH 6,5 und 8 nach 2900 Å verschoben. Bleiben Lösungen von Triose-Reduktion bei Zimmertemperatur stehen, so verschwinden die Maxima ziemlich rasch.

Die Absorption des Triose-Reduktions beruht auf dem Chromophor



welches auch den anderen aci-Reduktionen eigen ist. Diese können deshalb ähnliche Absorptionen verursachen (V. EULER U. EISTERT). Das Absorptionsspektrum des Triose-Reduktions soll mit dem des isomeren Hydroxybrenztraubenaldehyds identisch sein (BERL U. FEAZEL (2)).

- 6) Die Untersuchung einiger anderer Verbindungen (u.a. des Glukosons und verschiedener Saccharinsäuren) ergab, daß ihre Absorptionsspektren mit denen alkalischer Glukoselösungen überhaupt keine Ähnlichkeit haben (BERL U. FEAZEL (2)).

Wie der Vergleich zeigt, ist der in schwach alkalischen Lösungen von Glukose oder von Glyzerinaldehyd bzw.

Dioxyaceton bei gewöhnlicher Temperatur entstehende Farbstoff in seinen optischen Eigenschaften mit Triose-Redukton und dem Acetol-Farbstoff sehr nahe verwandt, aber nicht identisch. Dies weist auf strukturelle Ähnlichkeiten hin. BERL U. FEAZEL (2) halten es deshalb für wahrscheinlich, daß der Farbstoff aus Zucker-Spaltprodukten wie Glyzerinaldehyd, Dioxyaceton, Acetol oder Triose-Redukton durch Kondensation und anschließende Wasserabspaltung entsteht.

Im Gegensatz zu den alkalischen Glukoselösungen zeigen saure oder neutrale Lösungen von Glukose und Fructose nach dem Erhitzen Absorptionen, welche der des Hydroxymethylfurfuraldehyd (Maxima bei 2830 und 2280 Å) ähneln (vergl. S. 39). Diese werden sehr wahrscheinlich durch gefärbte Furanderivate verursacht (LIGETT U. DEITZ; s. auch KRÖNER U. KOTHE).

In industriellen Zuckererzeugnissen können sowohl die durch Laugen als auch die durch Säuren katalysierten Farbstoffe sowie anderweitige Verunreinigungen vorkommen. ZERBAN hat die Literatur hierüber zusammengestellt. Aus der oben zitierten Arbeit von LIGETT U. DEITZ, die über Farbe und Trübheit von Zuckererzeugnissen handelt, lassen sich bezüglich der Farbstoff-Entstehung folgende allgemein gültige Ausführungen entnehmen:

- 1) Farbstoffe bilden sich in Lösungen reduzierender Zucker schon durch die gleichzeitige Einwirkung von anorganischen Säuren oder Laugen (und vielleicht von Sauerstoff) und von Hitze oder Licht. Es gibt einige anscheinend spezifische Katalysatoren. Als solche kommen vor allem Aminosäuren und andere Stickstoffverbindungen, sowie Eisenoxyde und Sulfide in Betracht. (S. auch KRÖNER U. KOTHE).
- 2) Die Farbstoffe entstehen durch Polymerisation. Gewisse reaktionsfähige, ungesättigte Carbonylverbindungen von niedrigem Molekulargewicht, die unter vergleichbaren Bedingungen aus Lösungen reduzierender Zucker isoliert wurden, sind wahrscheinlich bereits Umwandlungsprodukte der Monomeren, die selber höchst labil sind.

- 3) Stickstoff- oder schwefelhaltige Gruppen können durch eine der typischen Carbonyl-Reaktionen zu Bestandteilen der Farbstoffe werden.
- 4) Beim Polymerisationsprozeß entstehen neue Kohlenstoff-Kohlenstoff-Bindungen (wie bei der Aldol-Kondensation oder der Dien-Addition) oder Sauerstoff-Brücken (Bildung von Aethern, Acetalen oder Estern unter Wasseraustritt); es kann auch zur Assoziation (Wasserstoff-Bindung) kommen.
- 5) Die Polymerisationsprodukte können ganz stabil oder ganz labil sein, was größtenteils von sekundären Reaktionen abhängt. Es handelt sich dabei grundsätzlich um weitere Wasserabspaltungen. Dadurch kommt es zu neuen Doppelbindungen, zur Bildung von Oxydringen, zum Aufbau längerer Ketten oder zu Querverbindungen. Die Stabilität eines Polymeren-Moleküls ist mit dem Grad seiner Dehydratisierung verknüpft.
- 6) Der Polymerisationsprozeß schreitet mit der Zeit immer weiter fort und es entstehen schließlich Verbindungen, die ein Minimum an freier Energie besitzen. Bei den meisten untersuchten, veränderlichen Farbstoffen handelt es sich also wahrscheinlich um Übergangsstadien auf dem Weg zu hochpolymeren, stabilen Endprodukten (BERL U. FEAZEL (2)).
- 7) Während des Polymerisationsprozesses breitet sich die Absorption nach dem langwelligen Gebiet zu aus, während ihre Intensität abnimmt. Dies wird erklärt durch Strukturen auf der Grundlage konjugierter α -Dicarbonylgruppen, in denen bei der Polymerisation die allgemeine Konjugation zunimmt, aber die Zahl der freien Carbonylgruppen durch die Bildung polymerer Aether-, Acetal- oder Esterbindungen verringert wird.
- 8) Verschiedene Reaktionsbedingungen, insbesondere die in der Lösung anwesenden Ionenarten, beeinflussen die Natur der gebildeten Farbstoffe. Sie bedingen Unter-

schiede in der Art und Zahl saurer Gruppen (Carboxyl- bzw. Enol-Gruppen). Verschiedene Kationen bilden Salze von verschiedener Löslichkeit. Di- und trivalente Basen neigen zur Bildung covalenter Salze und können auf diese Weise sonst labile Enole durch Ionenbindungen stabilisieren.

- 9) Auch Molekülgröße und Dispersionsgrad der Polymerisationsprodukte, welche den Trübheitsgrad der Lösungen bestimmen, sind von den Reaktionsbedingungen abhängig.

c) Die chemische Struktur der Farbstoffe

Von den beim alkalischen Abbau reduzierender Zucker entstehenden, braun gefärbten Substanzen wußte man zunächst lediglich, daß sie sich aus sehr reaktionsfähigen, Aldehyd- und Hydroxylgruppen-tragenden Spaltprodukten durch Polymerisation bilden (BUCHNER, MEISENHEIMER U. SCHADE). Die Aufspaltung der Glukose zu Triosen hat man schon frühzeitig als die erste Etappe auf dem Wege der Farbstoff-Bildung angesehen (FISCHLER (2); BERL U. FEAZEL (2)). Der chemische Bau der gefärbten Produkte war weitgehend unbekannt; man rechnete sie in die Gruppe der Huminsubstanzen (GABRYELSKI U. MARCHLEWSKI) und beschränkte sich darauf, sie nach ihrem Aussehen und ihren physikalischen Eigenschaften zu beschreiben, die schon in manchen Bezeichnungen - "Caramel", "rotbraune Farbstoffschmiere", "aetherlösliche Harze", "Teere" - zum Ausdruck kommen. Nach LIGETT U. DEITZ sind die heutigen Vorstellungen von der chemischen Struktur der Zuckerfarbstoffe, kurz zusammengefaßt, etwa folgende:

Wie schon oben ausgeführt, ist nicht nur die Menge, sondern auch die Natur der Farbstoffe von den Bedingungen ihrer Entstehung abhängig und unterliegt mit der Zeit oft weiteren Veränderungen. Aus den Eigenschaften der einfachen Moleküle, die unter jeweils denselben Bedingungen gefunden werden, kann man die chemischen und physikalischen Eigenschaften der Farbstoffe bis zu einem gewissen Grade vorhersagen. Es dominieren insbesondere ungesättigte α -Dicarbonylverbindungen und ihre Derivate.

In den Polymeren-Molekülen sind die Monomeren hauptsächlich durch Kohlenstoff-Kohlenstoff-Bindungen, aber auch durch Oxyd-Brücken und durch Assoziation verknüpft. Die auxochromophoren Gruppen sind wahrscheinlich Vertreter des Carboxylionen-Typs:



Im Lauf des Polymerisationsprozesses nehmen die allgemeine Konjugation und die Molekulargewichte zu, die Zahl freier Carbonylgruppen und der Dispersionsgrad dagegen ab.

Die Veränderungen der Lichtabsorption mit der Wasserstoffionen-Konzentration beruhen wahrscheinlich auf folgenden Vorgängen:

- 1) Änderungen der Konjugation durch die Umwandlung von Keto-Formen in Enol-Formen und umgekehrt (Indikatoreffekt; vergl. KRÖNER U. KOTHE).
- 2) Änderungen des Polymerisationsgrades.
- 3) Änderungen des Dispersionsgrades der Kolloide.

Teilweise sind diese Reaktionen leicht umkehrbar, teilweise verlaufen sie nur langsam zum ursprünglichen Gleichgewichtszustand zurück, und teils sind sie offenbar irreversibel.

LIGETT U. DEVLIN vermuten, daß Zuckerfarbstoffe immer aus einer ganzen Reihe ähnlicher Verbindungen von unterschiedlichem Molekulargewicht bestehen, wobei die niedriger molekularen Komponenten im kurzwelligeren, die höher molekularen Komponenten im langwelligeren Teil des Spektrums absorbieren. Die tatsächlich meßbaren Absorptionskurven sollen dann durch Überlagerung der einzelnen Teilabsorptionen zustande kommen.

Die Zusammenhänge zwischen chemischer Struktur und Lichtabsorption organischer Farbstoffe einschließlich der Elektronengastheorien werden bei KUHN ausführlich besprochen.

d) Die physikalischen Eigenschaften der Farbstoffe

1) Löslichkeit

HOPPE-SEYLER (1) erwärmte eine hochkonzentrierte Lösung von Traubenzucker und NaOH auf dem Wasserbad bis zum

Sieden, wobei es zu einer intensiven Schwärzung und zur Abscheidung kohligter Substanz kam. Beim Schütteln mit Aether gab die Lösung schmierige Zersetzungsprodukte an diesen ab. WINDISCH, KOLBACH U. RUCKDESCHEL berichten, daß die durch NaOH gebildeten Harze in Aether nur teilweise und schwer löslich sind. Bei der Aether-Extraktion der Milchsäure mit Hilfe eines PARTHEIL-ROSE-Apparates ging jedoch auch ein beträchtlicher Teil der Harze in den Aether über. Harze, welche in Invertzuckerlösungen bei 160 - 180° durch Einwirkung von Ba(OH)₂ entstehen, sollen fast ganz in Aether löslich sein. GABRYELSKI U. MARCHLEWSKI (1) extrahierten eine 72 Stunden lang mit NaOH behandelte Glukoselösung mit Aether. Sie erreichten dadurch nur eine ganz geringfügige Verschiebung des Absorptionsmaximums gegenüber dem vor der Aetherextraktion gemessenen Wert.

Bei EIGENEN VERSUCHEN gelang es uns nicht, den in alkalischen Glukoselösungen durch 5 Minuten langes Kochen gebildeten Farbstoff mit Aether auszuschütteln.

Werden die festen Bestandteile gefärbter, aber klarer Zuckerlösungen isoliert und getrocknet, so können sich - in Abhängigkeit von den Trocknungsbedingungen - beim erneuten Auflösen trübe Lösungen ergeben, ein Zeichen dafür, daß sich der Dispersionsgrad der gefärbten Substanzen geändert hat. Das Ausmaß des Phänomens wird durch anwesende anorganische Ionen entscheidend beeinflusst, was sicherlich mit der Valenz und der Koordinationskraft der verschiedenen Ionenarten zusammenhängt (LIGETT U. DEITZ).

2) Isolierung bzw. Entfernung der gefärbten Substanzen aus ihren Lösungen:

Die Harze, welche in einer Lösung von 10 g Invertzucker und 20 g Aetznatron in 100 ml Wasser bei mehrstündigem Kochen auf dem Wasserbad unter Rückflußkühlung entstanden waren, fällten WINDISCH, KOLBACH U. RUCKDESCHEL durch Salzsäure und wuschen sie mit salzsäurehaltigem, dann mit reinem warmen Wasser.

Beim Kochen von Glukose mit $\text{Ca}(\text{OH})_2$ konnte SCHEIBLER (1) aus den kondensierten Dämpfen durch Ausschütteln mit Aether und Abdestillieren desselben ein angenehm aromatisch riechendes Oel gewinnen. Es dürfte sich um die Stoffe gehandelt haben, welche den Caramelgeruch verursachen.

Mit Hilfe der Säulen-Chromatographie gelang es BERL U. FEAZEL (2), die in einer alkalischen Fructose-Lösung nach 18-stündigem Stehen vorhandenen reduzierenden Zucker und die gebildeten gefärbten Substanzen voneinander zu trennen. Die Lösung wurde bei pH 6 unter vermindertem Druck eingedampft, dann auf einer Säule aus pulverisierter Zellulose bei 60° mit Butanolwasser chromatographiert. Durch Eindampfen derjenigen Fraktion, welche den Farbstoff enthielt, entstand ein brauner Sirup, der nach erneutem Auflösen in Wasser eine Absorption zeigte, die mit jener der ursprünglichen Lösung praktisch identisch war. Beim wochenlangen Stehen setzte sich aus der Lösung des Farbstoffes langsam ein braunes, unlösliches Material ab, ein Zeichen dafür, daß der Farbstoff selbst womöglich ein Übergangsstadium darstellte auf dem Wege zu stabileren Produkten, welche durch weitere Kondensation und Wasserabspaltung aus ihm entstehen können.

Den soeben zitierten Autoren gelang es auch, den absorbierenden Farbstoff durch Passage über ein Anionen-Austausch-Harz (Amberlite IRA 400) aus den Lösungen zu entfernen. Er ließ sich aber durch Regeneration mit Säure aus dem Harz nicht in der ursprünglichen Form zurückgewinnen; die Absorptionsmaxima der resultierenden braunen Lösung waren gegenüber den Ausgangswerten etwas verschoben.

Mit Hilfe eines Anionen-Austausch-Harzes wurde auch aus Melassen ein Pigment isoliert, das aber gleichfalls als Artefact anzusehen ist. Ionen-Austauscher und weiter verschiedene Adsorbentien, wie z.B. Knochenkohle, Aktivkohle und Bauxit, wurden auch zur Reinigung von Rohrzucker-Rohprodukten mit gutem Erfolg verwendet (LIGETT U. DEITZ). Andere Reinigungsmaßnahmen, wie die Vorreinigung mit Phosphat, die Filtration mit Kieselgur oder mit Papier-Spezial-

filtrern und das Zentrifugieren, scheinen demgegenüber weniger wirksam zu sein.

Als zweckmäßigste Methode zur industriellen Reinigung von Rohrzucker gilt der "carbonation process", bei dem Kalkmilch und Kohlensäure bei Temperaturen zwischen 55 und 70° auf die Zuckerlösungen einwirken. Das zugefügte Calcium-Hydroxyd reagiert mit einem Teil der gefärbten Anionen unter Bildung schwer löslicher Salze, welche mit dem praecipitierten kohlensauren Kalk aus der Zuckerlösung entfernt werden. Es soll auf diese Weise möglich sein, 75 bis 80 % der Farbe zu beseitigen. Während des Kristallisations-Prozesses findet dann nur noch eine sehr geringe Farbstoffbildung statt. Man kann daher annehmen, daß bei der Carbonatisierung u.a. auch solche Komponenten aus den Lösungen eliminiert werden, die zwar selber farblos sind, sich aber beim Erhitzen in gefärbte Substanzen umwandeln können. Man hat sie deshalb auch als Leuko-Formen der Farbstoffe bezeichnet (HONIG).

Glukose und die anderen reduzierenden Zuckerarten sind, im Gegensatz zum Rohrzucker, sehr alkali-empfindlich (LOWITZ; WATSON, MUKERJE, GUPTA U. CHATURVEDI; JOLLES (1,4); SCHEIBLER (2)). Schon beim Kochen mit CaCO_3 (MURSCHHAUSER (1,2)), erst recht bei der Einwirkung von Ca(OH)_2 (MONTGOMERY (2); NEF (4); MALYOTH U. STEIN; SCHEIBLER (1); KILIANI; POWER U. UPSON) setzt der alkalische Glukoseabbau ein. Es ist deshalb nicht möglich, den geschilderten Carbonatisierungs-Prozeß auch zur Reinigung gefärbter Glukoselösungen anzuwenden.

Der in Aether lösliche Anteil der Harze läßt sich durch KMnO_4 entfärben; das Volumen der verbrauchten KMnO_4 -Lösung diene als Maß für die oxydierte Harzmenge (WINDISCH, KOLBACH U. RUCKDESCHEL).

Bei EIGENEN VERSUCHEN gelang es uns, durch anhaltendes Kochen mit viel H_2O_2 auch stärkere Grade der bräunlichen Farbe zum Verschwinden zu bringen, die sich in alkalisches, ohne und mit Trichloressigsäurezusatz gekochten Glukoselösungen entwickelt hatte.

3) Aussehen

Alkalische Glukoselösungen färben sich beim Kochen, aber langsam auch schon beim Stehen in der Kälte, nacheinander zartgelb, goldgelb, orangebräunlich, rötlichbraun, braun und dunkelbraun, unter Umständen sogar schwarzbraun. Gleichzeitig werden sie in zunehmendem Maße trüb. Die Trübung wird durch die nämlichen Substanzen verursacht, welche auch die Farbe bedingen, wenn diese sich zu hochpolymeren Produkten zusammenlagern und der Dispersionsgrad sinkt. Sie besitzen dann eher die Eigenschaften eines Pigmentes als die eines Farbstoffes und verursachen zugleich Lichtabsorption und Lichtstreuung (LIGETT U. DEITZ). Werden die gefärbten Materialien, soweit möglich, isoliert und eingedickt, so erhält man amorphe, schmierige, zähe Produkte, die man als Sirup (BERL U. FEAZEL (2)), Farbstoff-Schmiere (FISCHLER (2)), Harze (NEF (4); WINDISCH, KOLBACH U. RUCK-DESCHEL), Teere (EVANS U. MITARB. (1,2,6)) bezeichnet hat.

Bei UNSEREN VERSUCHEN verblaßte die Farbe in den ohne und mit Trichloressigsäurezusatz 5 Minuten lang gekochten alkalischen Glukoselösungen allmählich, wenn diese an der Luft und im zerstreuten Tageslicht bei Zimmertemperatur stehen blieben. Dabei nahm nicht nur der Farbgrad ab, sondern auch die Farbsättigung, und es resultierten wäßrige, blaßbräunliche Töne, die von einer leichten Trübung begleitet waren.

Wurden die Lösungen nach dem Erkalten angesäuert, so trat ein deutlicher Farbverlust ein. Schwache Gelbfärbungen verschwanden dabei vollständig, stärkere Farbgrade verblaßten zu hellen, bräunlich-gelblichen Tönen. Bei erneutem Alkali-Zusatz trat die ursprüngliche Farbe wieder in Erscheinung. Der Farbcharakter blieb bei diesem Farbumschlag weitgehend erhalten.

Nach LIGETT U. DEITZ ist die Farbminderung beim Ansäuern nur teilweise eine augenblickliche und es kann mehrere Stunden dauern, bis ein stabiler Wert erreicht ist, während

umgekehrt der Farbumschlag beim Alkalisieren momentan erfolgt. Die Erscheinung erinnere an Keto-Enol-Tautomerismus.

4) UV-Absorption

Bei der Betrachtung der UV-Absorptionskurven alkalischer Glukoselösungen zeigt es sich, daß diese - wie nicht anders zu erwarten - in Abhängigkeit von den Reaktionsbedingungen sehr große Unterschiede aufweisen. Bemerkenswert ist, daß beim Übergang von alkalischer zu saurer Reaktion die Kurven nach kürzeren Wellenlängen verschoben werden, ihre Form aber im wesentlichen beibehalten.

Die relativ einfachen Kurven, welche BERL U. FEAZEL (2) in Lösungen von 3 % Glukose in 0,01 n NaOH bei gewöhnlicher Temperatur und unter Luftzutritt nach längerer Reaktionsdauer erhielten, hatten im alkalischen Bereich bei 2950 Å, im sauren Bereich bei 2650 Å ein Absorptionsmaximum; andere Autoren erzielten unter ähnlichen Versuchsbedingungen ähnliche Ergebnisse (vergl. S. 49). Schon die Verminderung der NaOH-Konzentration bei gleichzeitiger Verlängerung der Versuchsdauer (GABRYELSKI U. MARCHLEWSKI (2)) oder leichte Temperatur-Erhöhdungen - bei 40° fanden SHOU U. WURMSER ein Maximum bei 2850 Å, FISCHLER, HAUSS U. TÄUFEL ein Maximum bei 2842 Å - verändern jedoch die Werte. Allgemein gilt, daß bei höheren Alkalikonzentrationen oder höheren Temperaturen Absorptionsspektren entstehen, die komplexerer Natur und schwieriger zu interpretieren sind (BERL U. FEAZEL (2)).

Um vergleichbare Werte zu erhalten, haben wir bei unseren EIGENEN MESSUNGEN die alkalischen Glukoselösungen stets 5 Minuten lang im Wasserbad gekocht, mit Leitungswasser gekühlt und ihre Absorption sofort gemessen. Sie hatten sich gelblich-bräunlich verfärbt; nach Säurezusatz nahmen sie eine blaßgelbliche Farbe an. Als Vergleichsprobe verwendeten wir immer eine Lösung, die - bis auf die zu prüfende Substanz, in diesem Falle also die Glukose - alle übrigen Bestandteile in derselben Konzentration enthielt und ebenso behandelt worden war, wie die zu untersuchende, gefärbte Lösung.

Unter diesen Bedingungen ermittelten wir für eine schwach alkalische Glukoselösung (15 ml 0,3 %iger Glukoselösung + 0,045 ml 20 %iger NaOH) ein Absorptionsmaximum bei 2870 Å und ein Minimum bei 2300 Å, nach dem Ansäuern nur ein Maximum bei 2660 Å (Abb. 3), und für eine stark alkalische Lösung (15 ml 0,3 %iger Glukoselösung + 1 ml 33 %iger NaOH) ein Maximum bei 2750 Å und ein scharfes Minimum bei 2400 Å, Werte, die durch Säurezusatz nach 2660 Å bzw. 2350 Å verschoben wurden (Abb. 4). Der im langwelligen Gebiet beginnende ansteigende Teil der Kurven zeigte in allen Fällen einen wellenförmigen Verlauf. Die Kurven verliefen bei hoher NaOH-Konzentration flacher und die gesamte Lichtabsorption war geringer, als bei niedriger NaOH-Konzentration. Auffallend ist, daß das Absorptionsmaximum bei saurer Reaktion in beiden Fällen bei der gleichen Wellenlänge (2660 Å) gefunden wurde und daß dieser Wert auch mit den für nicht erwärmte alkalische Glukoselösungen in der Literatur angegebenen Zahlen, nämlich 2660 Å (V. EULER, HASSELQUIST U. HANS-HOFF (1)) bzw. 2650 Å (BERL U. FEAZEL (2)) gut übereinstimmt (vergl. S. 49).

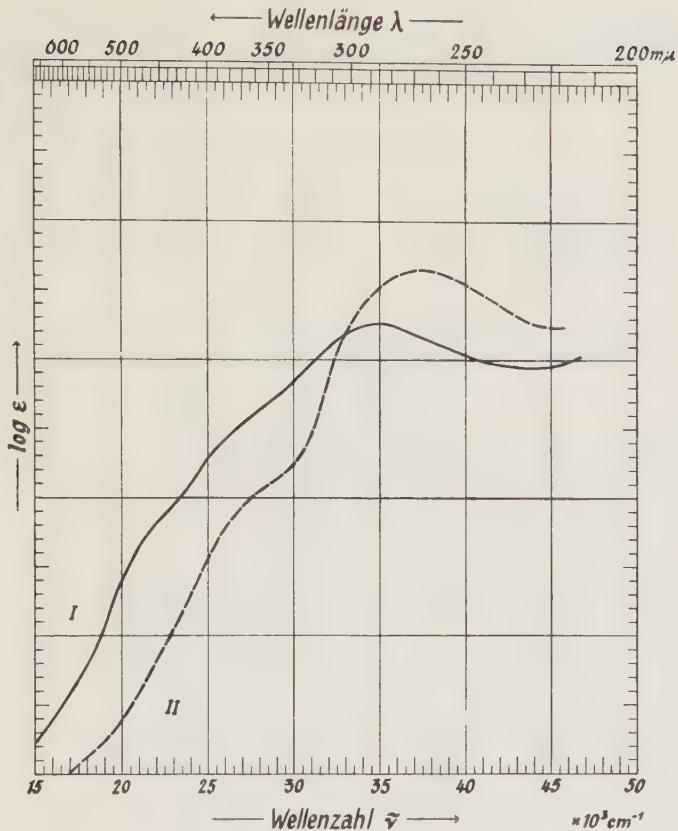


Abbildung 3

- I Glukoselösung 0,3 %ig 15 ml + NaOH 20 %ig 0,045 ml,
im Wasserbad 5 Min. gekocht,
gegen H_2O + NaOH gleicher Konzentration
- II Glukoselösung 0, 3 %ig 15 ml + NaOH 20 %ig 0,045 ml,
im Wasserbad 5 Min. gekocht, dann angesäuert mit HCl,
gegen H_2O + NaOH + HCl gleicher Konzentration

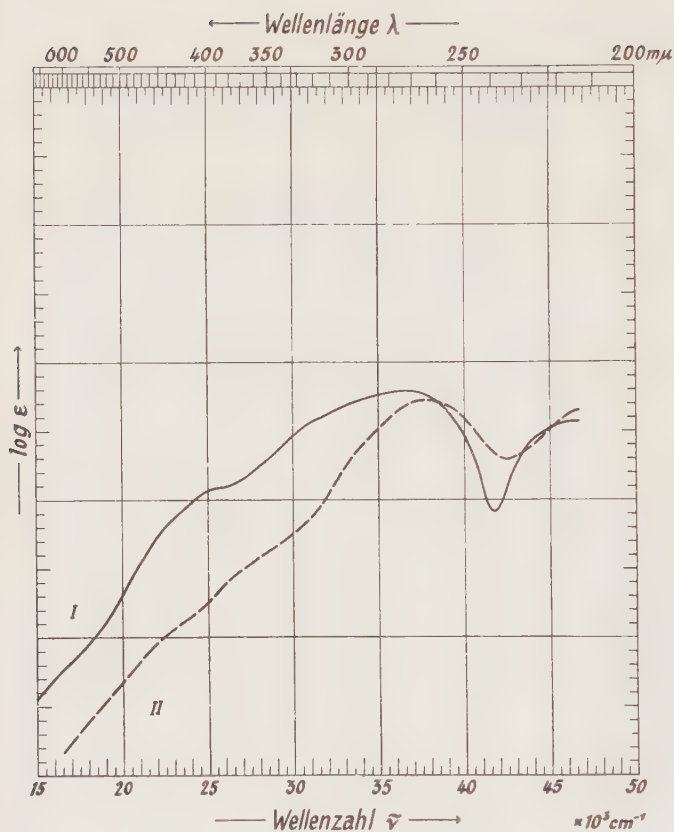


Abbildung 4

- I Glukoselösung 0,3 %ig 15 ml + NaOH 33 %ig 1 ml,
im Wasserbad 5 Min. gekocht,
gegen H_2O + NaOH gleicher Konzentration
- II Glukoselösung 0,3 %ig 15 ml + NaOH 33 %ig 1 ml,
im Wasserbad 5 Min. gekocht, dann angesäuert mit HCl,
gegen H_2O + NaOH + HCl gleicher Konzentration

DIE GELBFÄRBUNG IN MIT NATRONLAUGE GEKOCHTEN GLUKOSELÖSUNGEN
BEI ZUSATZ VON P-NITROPHENOL (EIGENE UNTERSUCHUNGEN)

Heiße alkalische Glukoselösungen sind fähig, die Nitrogruppen zahlreicher aromatischer Nitrokörper zu reduzieren (s.S. 29 - 34). In der Literatur fanden wir jedoch nirgends Angaben darüber, ob sie auch mit p-Nitrophenol reagieren. Um diese Frage zu klären, haben wir deshalb EIGENE VERSUCHE angestellt.

I) DIE GELBFÄRBUNG IN GEMISCHEN VON P-NITROPHENOL UND MIT NATRONLAUGE GEKOCHTEN GLUKOSELÖSUNGEN

a) Bei schwach alkalischer Reaktion

- 1) 15 ml einer 0,2 %igen Glukoselösung wurden mit 0,045 ml 20 %iger NaOH versetzt und 5 Minuten lang im Wasserbad gekocht, wobei die Probe eine gelblich-bräunliche Farbe annahm; beim Ansäuern wurde sie blaßgelb. Das Absorptionsspektrum der alkalischen Lösung zeigte ein breites Maximum bei 2770 Å und ein Minimum bei 2400 Å; die saure Lösung hatte ein Maximum bei 2660 Å und ein angedeutetes Minimum bei 2300 Å (Abb. 5).
- 2) Eine zweite Probe der selben Zusammensetzung wurde ebenfalls 5 Minuten lang gekocht. Nach dem Abkühlen wurden der Lösung 0,2 ml einer 0,1 %igen p-Nitrophenol-Lösung zugesetzt. Sie färbte sich dadurch etwas dunkler und gelblicher; nach dem Ansäuern war sie, wie jene ohne p-Nitrophenol, blaßgelb.

Die Absorptionskurven des Gemisches sind in Abb. 6 aufgetragen. Sie ähneln in groben Zügen denen der entsprechenden, mit Alkali behandelten reinen Glukoselösung (Abb. 5, s.o.). Die Kurve für die alkalische Lösung besitzt im kurzwelligen Bereich zwei Maxima bei 2880 Å und 2700 Å, von denen das zweite nur angedeutet ist, und ein Minimum bei 2350 Å, das aber sehr flach verläuft. In dem ansteigenden Teil der Kurve findet sich zusätzlich ein Maximum bei 3800 Å, das wir auf die Gegenwart von p-Nitrophenol

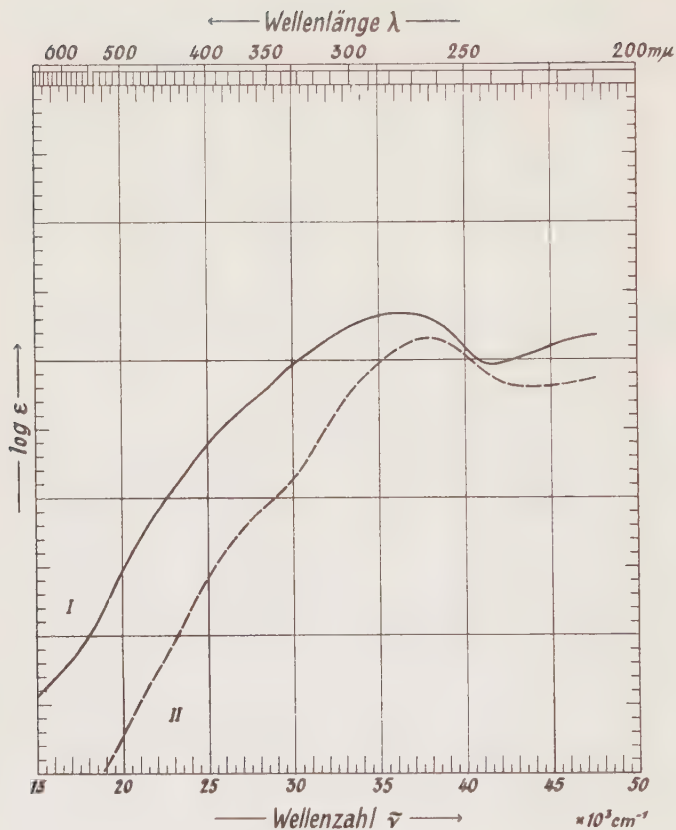


Abbildung 5

- I Glukoselösung 0,2 %ig 15 ml + NaOH 20 %ig 0,045 ml,
im Wasserbad 5 Min. gekocht,
gegen H_2O + NaOH gleicher Konzentration
- II Glukoselösung 0,2 %ig 15 ml + NaOH 20 %ig 0,045 ml,
im Wasserbad 5 Min. gekocht, dann angesäuert mit HCl,
gegen H_2O + NaOH + HCl gleicher Konzentration

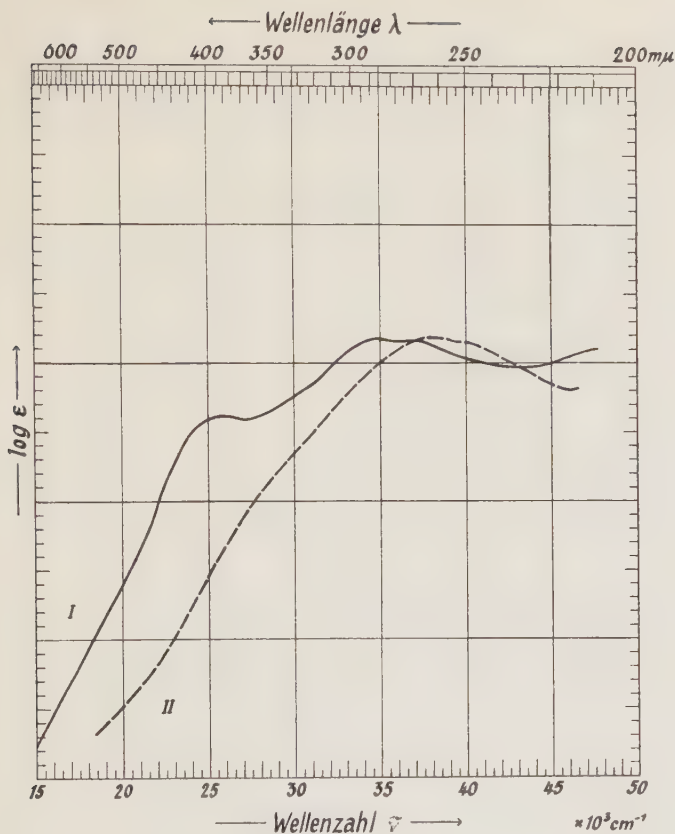


Abbildung 6

- I Glukoselösung 0,2 %ig 15 ml + NaOH 20 %ig 0,045 ml,
im Wasserbad 5 Min. gekocht, dann vermischt mit
p-Nitrophenol-Lösung 0,1 %ig 0,2 ml,
gegen H_2O + NaOH gleicher Konzentration
- II Glukoselösung 0,2 %ig 15 ml + NaOH 20 %ig 0,045 ml,
im Wasserbad 5 Min. gekocht, dann vermischt mit
p-Nitrophenol-Lösung 0,1 %ig 0,2 ml
und angesäuert mit HCl,
gegen H_2O + NaOH + HCl gleicher Konzentration

zurückführen, und ein Minimum bei 3700 Å. Nach dem Säurezusatz war nur ein Maximum bei 2620 Å vorhanden.

b) Bei stark alkalischer Reaktion

1) 15 ml einer 0,3 %igen Glukoselösung wurden mit 1 ml 33 %iger NaOH versetzt und 5 Minuten lang im Wasserbad gekocht. Die Probe zeigte jetzt eine gelblich-bräunliche Farbe; beim Ansäuern wurde sie blaßgelb. Die Absorptionskurven einer solchen Lösung sind in Abb. 4 dargestellt und wurden auf Seite 60 beschrieben.

2) Nach dem Abkühlen wurden 0,19 ml einer 0,1 %igen p-Nitrophenol-Lösung hinzugefügt. Dadurch nahm das Gemisch einen etwas dunkleren, mehr gelbstichigen Farbton an; bei Säurezusatz wurde es, genau wie die mit Alkali gekochte Glukoselösung, blaßgelb.

Die Absorptionskurven des Gemisches sind in Abb. 7 wiedergegeben. Die bei alkalischer Reaktion ermittelte Kurve besitzt, wie p-Nitrophenol-Natrium, ein Maximum bei 4000 Å; ein zweites Maximum bei 2700 Å entspricht fast dem Maximum der mit NaOH gekochten, reinen Glukoselösung, das bei 2750 Å liegt (vergl. Abb. 4, S. 60). Minima wurden bei 3600 und 2400 Å gefunden. Die zweite, nach Säurezusatz gemessene Kurve ist gegenüber der ersten nach kürzeren Wellenlängen verschoben. Sie hat nur ein sehr flach verlaufendes Maximum bei 2600 Å, das dem der angesäuerten Glukoselösung bei 2660 Å ebenfalls recht nahe kommt, und ebenso wie jene ein Minimum bei 2400 Å, das aber nur schwach ausgeprägt ist. Zwischen 3700 und 3000 Å zeigt der ansteigende Teil der Kurve gegenüber dem Verlauf der entsprechenden Glukosekurve eine leichte Erhebung; freies p-Nitrophenol hat in diesem Bereich, nämlich bei 3200 Å, ein Absorptionsmaximum (vergl. Abb. 2, S. 7).

3) Ein Vergleich mit den Absorptionskurven des reinen p-Nitrophenols (Abb. 2, S. 7) und der reinen, mit

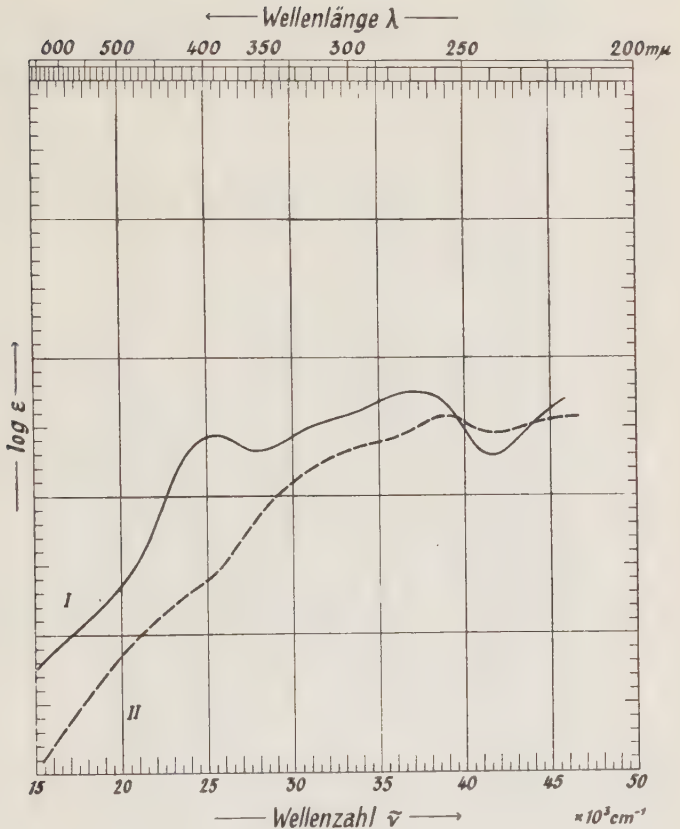


Abbildung 7

- I Glukose 0,3 %ig 15 ml + NaOH 33 %ig 1 ml,
im Wasserbad 5 Min. gekocht. dann vermisch mit
p-Nitrophenol-Lösung 0,1 %ig 0,19 ml,
gegen H_2O + NaOH gleicher Konzentration
- II Glukose 0,3 %ig 15 ml + NaOH 33 %ig 1 ml,
im Wasserbad 5 Min. gekocht, dann vermisch mit
p-Nitrophenol-Lösung 0,1 %ig 0,19 ml
und angesäuert mit HCl,
gegen H_2O + NaOH + HCl gleicher Konzentration

NaOH gekochten Glukoselösung (Abb. 4, S. 60) zeigt, daß es sich bei den im vorhergehenden Abschnitt beschriebenen Ergebnissen wahrscheinlich um Mischabsorptionen handelt, die durch Summation der Absorptionen der beiden gefärbten Bestandteile der Lösung zustande kommen. Es mußte aber auch daran gedacht werden, daß womöglich doch eine chemische Reaktion zwischen p-Nitrophenol und der alkalischen Glukoselösung erfolgt war und eine Veränderung der Teilabsorptionen bewirkt hatte.

Aus diesem Grunde haben wir die Messungen wiederholt. Diesmal wurden aber die Glukoselösung und die p-Nitrophenol-Lösung in getrennte Küvetten gefüllt und bei der Messung nintereinander geschaltet. Dabei erhielten wir die in Abb. 8 dargestellten Absorptionskurven, die sich hinsichtlich der Lage ihrer Maxima und Minima von denen der Abb. 7 kaum unterscheiden. Damit ist es als bewiesen anzusehen, daß es sich dort tatsächlich um Mischkurven handelt. Eine chemische Reaktion, welche die Absorption der beiden Komponenten beeinflußt hätte, war also beim Vermischen der mit NaOH gekochten Glukoselösung mit p-Nitrophenol nicht erfolgt.

II) DIE GELBFÄRBUNG IN ALKALISCHEN GLUKOSELÖSUNGEN, DENEN VOR DEM KOCHEN P-NITROPHENOL ZUGESETZT WURDE

Zur Klärung der Frage, ob heiße alkalische Glukoselösungen auf p-Nitrophenol einwirken können, wurden nun p-Nitrophenol und Glukose in alkalischer Lösung gemeinsam erhitzt:

a) Bei schwach alkalischer Reaktion

15 ml einer 0,2 %igen Glukoselösung wurden mit 0,045 ml 20 %iger NaOH und 0,2 ml 0,1 %iger p-Nitrophenol-Lösung versetzt. Die Lösung zeigte jetzt die intensiv grünlich-gelbe Farbe des p-Nitrophenolates. Nach 5 Minuten Kochen im Wasserbad hatte sie eine dunkelgelblich-bräunliche Far-

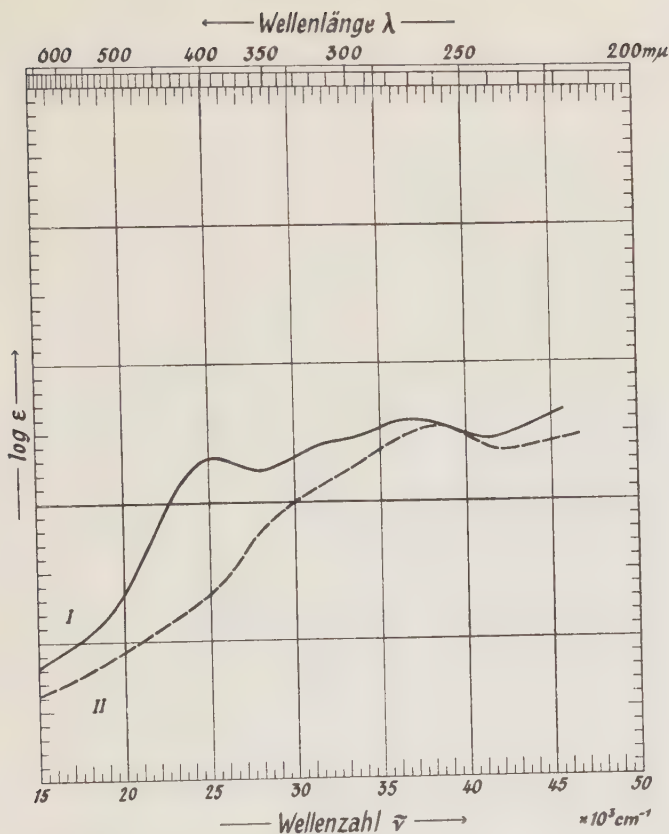


Abbildung 8

I Hintereinandergeschaltet in zwei getrennten Küvetten:

a) Glukoselösung 0,3 %ig 15 ml + NaOH 33 %ig 1 ml,
im Wasserbad 5 Min. gekocht;

b) p-Nitrophenol-Lösung 0,1 %ig 0,19 ml
+ NaOH 33 %ig 1 ml + H_2O 15 ml.

Vergleichslösung: H_2O + NaOH gleicher Konzentration
in doppelter Schichtdicke.

II Wie I, aber alle Lösungen angesäuert mit HCl

be, die bei Säurezusatz in einen blaßgelben Farbton überging.

Bei der Absorptionsmessung wurden die Kurven der Abb. 9 erhalten. Sie ähneln den in Abb. 7 dargestellten, auf S. 62 beschriebenen Kurven, die nach der Vermischung der alkalisch behandelten Glukoselösung mit p-Nitrophenol erhalten wurden, weitgehend. Lediglich im kurzwelligen Gebiet, jenseits von $3000 \text{ \AA}$, zeigen sie geringe Abweichungen. So liegt bei alkalischer Reaktion das Maximum diesmal bei $2950 \text{ \AA}$, während das benachbarte Maximum verwischt ist, und das Minimum liegt bei $2380 \text{ \AA}$ und ist stärker ausgeprägt. Die Kurven kommen also jenen der reinen Glukoselösung etwas näher, als die Kurven des Gemisches (Abb. 5; S. 61). Da jedoch, wie bereits geschildert, die optischen Eigenschaften des Glukosefarbstoffes sich schon unter dem Einfluß des Zeitfaktors erheblich ändern, kann nicht mit Sicherheit gesagt werden, ob dieser geringfügige Unterschied in den Absorptionskurven auf eine chemische Reaktion zwischen p-Nitrophenol und der alkalischen Glukoselösung zurückzuführen ist, oder ob er vielleicht nur durch eine kleine Differenz der Meßzeiten hervorgerufen wurde.

b) Bei stark alkalischer Reaktion

Da die Reduktionskraft alkalischer Glukoselösungen sehr stark von der Wasserstoffionen-Konzentration abhängt, haben wir einen analogen Kochversuch bei hoher Alkali-Konzentration durchgeführt.

15 ml einer 0,3 %igen Glukoselösung wurden mit 1 ml 33 %iger NaOH und 0,19 ml 0,1 %iger p-Nitrophenol-Lösung vermischt. Es ergab sich eine intensiv grünlichgelb gefärbte Flüssigkeit. Nach 5 Minuten Kochen im Wasserbad hatte sie eine gelblichbraune Farbe angenommen. Beim tropfenweisen Zusatz verdünnter HCl beobachteten wir in der Nähe des Neutralpunktes einen blassen, rötlichen Farbton, der schließlich, beim Erreichen deutlich saurer Reaktion, in ein blasses Gelb überging.

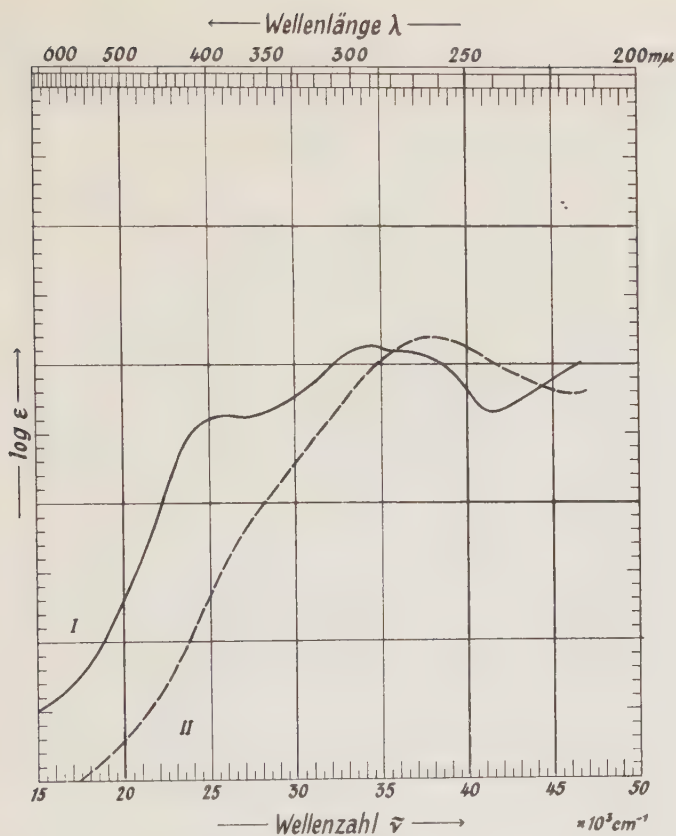


Abbildung 9

- I Glukoselösung 0,2 %ig 15 ml + p-Nitrophenol-Lösung 0,1 %ig 0,2 ml + NaOH 20 %ig 0,045 ml, im Wasserbad 5 Min. gekocht, gegen H_2O + NaOH gleicher Konzentration
- II Glukoselösung 0,2 %ig 15 ml + p-Nitrophenol-Lösung 0,1 %ig 0,2 ml + NaOH 20 %ig 0,045 ml, im Wasserbad 5 Min. gekocht, dann angesäuert mit HCl, gegen H_2O + NaOH + HCl gleicher Konzentration

Die Absorptionskurven der gekochten Lösung sind in Abb. 10 aufgetragen. Wie ein Vergleich mit den Kurven des nach dem Erkalten hergestellten Gemisches aus mit NaOH vorbehandelter Glukoselösung und p-Nitrophenol (Abb. 7 und 8), S. 62/63, und mit denen der entsprechenden reinen, mit Natronlauge gekochten Glukoselösung (Abb. 4, S. 60) zeigt, wurden diesmal Absorptionswerte ermittelt, die denen der reinen Glukoselösung praktisch gleich sind. Lediglich das Absorptionsminimum der sauren Lösung liegt weiter im kurzwelligen Gebiet, nämlich bei 2270 Å, als das der entsprechenden Glukose-Kurve bei 2350 Å. Der ganze Kurvenverlauf ist ein anderer als bei dem Gemisch, insbesondere ist das für jenes besonders charakteristische Absorptionsmaximum der alkalischen Lösung bei 4000 Å diesmal nicht nachweisbar.

Damit wurde der Beweis erbracht, daß in siedender, stark alkalischer Lösung von Glukose und p-Nitrophenol eine Reaktion eintritt, bei welcher das p-Nitrophenol chemisch so verändert wird, daß seine spezifische Absorption verloren geht. Das Reaktionsprodukt scheint keine eigene Absorption zu bewirken. Das molare Verhältnis zwischen p-Nitrophenol und Glukose betrug bei unserem Versuch etwa 1:4000; es war also ein großer Überschuß von Glukose vorhanden.

Ausgehend von dem Gedanken, daß p-Nitrophenol zu p-Aminophenol reduziert und dieses in der heißen, stark alkalischen Glukoselösung unter Bildung SCHIFF'scher Basen gebunden worden sein könnte (vergl. S. 34-36), haben wir eine stark alkalische Lösung von p-Nitrophenol mit einem sehr großen Überschuß von Glukose über der Flamme aufgekocht, danach - zur Spaltung eventuell gebildeter SCHIFF'scher Basen - angesäuert und nochmals einige Minuten lang gekocht. In der so erhaltenen hellgelben Lösung versuchten wir, p-Aminophenol mit Hilfe von o-Kresol als Indophenolblau nachzuweisen. Dies gelang jedoch nicht.

Wir haben also bei unseren Versuchen keine Antwort erhalten auf die Frage, welche chemischen Veränderungen

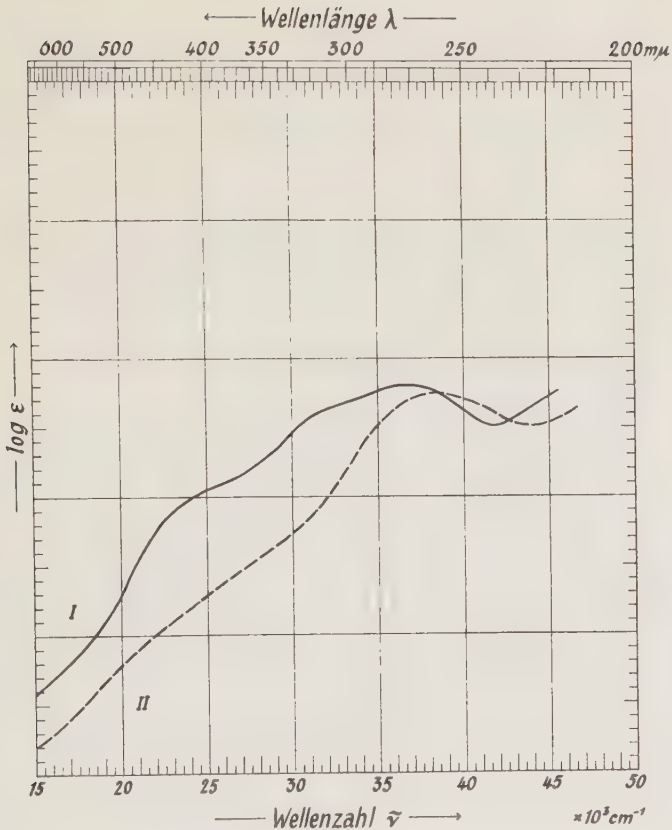


Abbildung 10

- I Glukoselösung 0,3 %ig 15 ml + NaOH 33 %ig 1 ml
+ p-Nitrophenol-Lösung 0,1 %ig 0,19 ml,
im Wasserbad 5 Min. gekocht,
gegen H_2O + NaOH gleicher Konzentration
- II Glukoselösung 0,3 %ig 15 ml + NaOH 33 %ig 1 ml
+ p-Nitrophenol-Lösung 0,1 %ig 0,19 ml,
im Wasserbad 5 Min. gekocht, dann angesäuert mit HCl
gegen H_2O + NaOH + HCl gleicher Konzentration

das p-Nitrophenol in einer stark alkalischen Glukose-lösung beim Erhitzen erleidet.

III) DIE GELBFÄRBUNG BEI DER ALKALISCHEN VERSEIFUNG VON E 605-WIRKSTOFF IN GEGENWART VON GLUKOSE

Alle Versuche wurden mit einer Lösung von 14 mg Diaethyl-p-Nitrophenyl-Thiophosphat in 1000 ml H_2O durchgeführt. Die verwendete Glukoselösung enthielt 0,2 % Glukose. Die Natronlauge war 33 %ig.

a) In Abwesenheit von Oxydationsmitteln

1) Bei gewöhnlicher Temperatur

2 ml E 605-Wirkstoff-Lösung + 2 ml Glukoselösung + 2 Tropfen NaOH wurden vermischt und bei Zimmertemperatur weiter beobachtet. Nach 2 Stunden war die Lösung noch wasserhell. Später entwickelte sich sehr langsam eine zunächst sehr zarte, gelbe bis goldgelbe Farbe, die durch Säurezusatz anfänglich noch zum Verschwinden gebracht werden konnte. Der grünlich-gelbe Farbton des reinen p-Nitrophenol-Natriums trat nicht auf.

Auch bei Zusatz einer gleichen Menge 20 %iger Trichloressigsäurelösung (+ NaOH zum Neutralisieren) zeigte die Gelbfärbung in einem solchen Gemisch dasselbe Verhalten.

2) Beim Erwärmen

2 ml E 605-Wirkstoff-Lösung + 2 ml Glukoselösung + 2 Tropfen NaOH wurden minutenlang über der Flamme gekocht. Es entwickelte sich dabei eine zunächst zartgelbe, dann goldgelbe, dann bräunliche und schließlich hellbraune Farbe, die nach Säurezusatz in ein blasses, bräunliches Gelb überging. Die zarte, grünlichgelbe Farbe des p-Nitrophenol-Natriums, die in einer ebenso konzentrierten, aber glukose-

freien E 605-Wirkstoff-Lösung unter denselben Bedingungen entsteht, trat nicht in Erscheinung.

Wurde eine wie oben hergestellte Ausgangslösung im Verhältnis 1:1 mit 20 %iger Trichloressigsäurelösung verdünnt, mit NaOH wieder alkalisiert und über der Flamme gekocht, so war die Intensität der entstehenden goldgelben bis bräunlichen Farbe der Verdünnung entsprechend geringer; ihr Charakter und dessen Veränderungen während des Kochens waren jedoch die selben wie bei dem Versuch ohne Trichloressigsäure.

b) In Anwesenheit von Wasserstoff-Superoxyd
(vergl. S. 9/10 und S. 43/44).

1) Bei gewöhnlicher Temperatur

2 ml E 605-Wirkstoff-Lösung wurden mit 2 ml Glukoselösung, 2 Tropfen NaOH und 4 Tropfen Perhydrol vermischt und bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Die Lösung färbte sich langsam grünlichgelb. Die nach etwa 30 Minuten voll ausgebildete Gelbfärbung glich jener, die in einer gleich konzentrierten, reinen E 605-Wirkstoff-Lösung beim Kochen mit NaOH entstand, und veränderte sich im Laufe der nächsten Stunden nicht mehr.

In Gegenwart von Trichloressigsäure und einer entsprechend größeren NaOH-Menge wurde das selbe Ergebnis erzielt.

2) Beim Erwärmen

2 ml E 605-Wirkstoff-Lösung + 2 ml Glukoselösung + 2 Tropfen NaOH + 4 Tropfen Perhydrol wurden vermischt und über der Flamme erhitzt. Schon weit unterhalb der Siedetemperatur begann in der Flüssigkeit die Entwicklung einer zarten, grünlichgelben Farbe, die sehr schnell ihren Höhepunkt erreichte und beim weiteren Kochen wieder verblaßte. Zum Zeitpunkt

ihrer vollen Ausbildung entsprach diese Gelbfärbung jener, die bei der Alkalikochprobe in einer reinen E 605-Wirkstoff-Lösung gleicher Konzentration entstand; ebenso wie jene verschwand sie beim Ansäuern. Eine goldgelbe oder bräunliche Farbe, wie sie sonst beim Erhitzen alkalischer Glukoselösungen stets entsteht, trat unter diesen Bedingungen in Gegenwart von Wasserstoff-Superoxyd nicht auf, und auch der Geruch nach Caramel blieb aus.

Die Wirkung, die Wasserstoff-Superoxyd auf die Gelbfärbung ausübt, welche in einer alkalischen Lösung von E 605-Wirkstoff und Glukose beim Erhitzen entsteht, war auch in Gegenwart von Trichloressigsäure nachweisbar.

Es hat sich also gezeigt, daß Wasserstoff-Superoxyd bei den angegebenen Konzentrationsverhältnissen in alkalischen Lösungen von E 605-Wirkstoff und Glukose - auch in Gegenwart von Trichloressigsäure - die Bildung des Glukosefarbstoffes verhindert. Zugleich wird die grünstichige Gelbfärbung, die bei der Einwirkung von NaOH auf Diaethyl-p-Nitrophenyl-Thiophosphat sonst erst beim Aufkochen entsteht, in ihrer Entwicklung sehr gefördert. In der Siedehitze wird sie aber durch H_2O_2 bald wieder zerstört.

Z U S A M M E N F A S S U N G

In der vorliegenden Arbeit über die Gelbfärbung des p-Nitrophenol-Natriums in Gegenwart von Glukose haben wir zunächst Literaturstudien und eigene Untersuchungen angestellt über die gelbe Farbe des p-Nitrophenol-Natriums und über Entstehung, Struktur und Eigenschaften der gelb bis braun gefärbten Substanzen, die sich in Glukoselösungen bei der Einwirkung von Alkalien bilden. In eigenen Versuchen wurde dann der Frage nachgegangen, wie sich die Gelbfärbung in alkalischen Lösungen verhält, die p-Nitrophenol und Glukose zugleich enthalten. Dabei hat sich folgendes ergeben:

- 1) Alkalische Lösungen von p-Nitrophenol haben eine gleichbleibende, grünstichig-gelbe Farbe, die beim Ansäuern verschwindet. In alkalischer und in saurer Lösung liefert p-Nitrophenol unterschiedliche, aber konstante und sehr charakteristische Absorptionskurven.
- 2) Bei der Einwirkung von Alkalien auf Glukose spielen sich sehr komplizierte Abbauvorgänge ab. Ihr Ausmaß hängt von den Reaktionsbedingungen ab, insbesondere von Alkali-Konzentration und Temperatur. Es handelt sich im wesentlichen um Isomerisierungen, Molekülspaltungen und Umlagerungen zu Saccharinsäuren. Intermediär kommt es dabei zur Bildung hochwirksamer, reduzierender Verbindungen, die eine Endiol-Gruppe besitzen und die als Reduktone bzw. Reduktonate bezeichnet werden. Siedende alkalische Glukoselösungen sind deshalb fähig, aromatische Nitroverbindungen zu Hydroxylamino- oder Aminoverbindungen zu reduzieren. Es wurde die Frage erörtert, ob es möglich ist, daß hierbei entstehende aromatische Aminoverbindungen in den heißen alkalischen Glukoselösungen dann chemisch gebunden werden.
- 3) Durch Polymerisation sehr labiler, intermediärer Spaltprodukte bilden sich in den alkalischen Glukoselösungen

gefärbte Substanzen, die hinsichtlich ihrer Menge und ihrer Natur ebenfalls von den Reaktionsbedingungen abhängig sind. Sie verleihen den Lösungen eine veränderliche Farbe in Schattierungen zwischen goldgelb und braun und bewirken in ihnen eine langsam zunehmende Trübung. Die Absorptionsspektren alkalischer Glukoselösungen sind deshalb unterschiedlich, veränderlich und nicht charakteristisch. Beim Ansäuern tritt ein Farbverlust ein und die Kurven werden nach kürzeren Wellenlängen verschoben.

- 4) Mit Hilfe der Absorptionsspektren konnten wir nachweisen, daß in siedenden, stark alkalischen Glukoselösungen p-Nitrophenol chemisch so verändert wird, daß seine spezifische Absorption verloren geht. Während Gemische aus p-Nitrophenol und einer mit NaOH gekochten Glukoselösung Kurven ergaben, die denen der reinen Glukoselösung zwar ähnelten, aber durch p-Nitrophenol in charakteristischer Weise modifiziert waren, erhielten wir nach dem gemeinsamen Kochen von p-Nitrophenol und Glukose in stark alkalischer Lösung die selben Kurven, wie für eine reine Glukoselösung der selben Konzentration. Der Nachweis von p-Aminophenol in einer solchen Lösung gelang uns auch nach Säurehydrolyse nicht. In einer schwach alkalischen Lösung konnten wir dagegen eine Veränderung des p-Nitrophenols nicht nachweisen.
- 5) Die Anwesenheit von Trichloressigsäure verändert weder die gelbe Farbe des p-Nitrophenol-Natriums, noch den Verlauf der Alkalikochprobe in Lösungen von E 605-Wirkstoff, sofern die zur Neutralisation der Säure notwendige Menge NaOH zusätzlich hinzugefügt wird. Ist diese Bedingung erfüllt, so beeinflusst Trichloressigsäure auch die Farbstoffbildung in alkalischen Glukoselösungen nicht.
- 6) Durch Wasserstoff-Superoxyd läßt sich die Verfärbung der alkalischen Glukoselösungen verhindern. Die Gelbfärbung, die bei der Einwirkung von NaOH auf den E 605-Wirkstoff

entsteht, wird durch H_2O_2 in ihrer Entwicklung gefördert; Wasserstoff-Superoxyd zerstört aber in der Siedehitze schließlich auch das p-Nitrophenol.

L I T E R A T U R

- Abele G. Kritische Betrachtungen über den Nachweis und die quantitative Bestimmung von O,O-Diaethyl-O-p-Nitrophenylmonothiophosphat (E 605). Dtsch. Medizin. J. 5, 681 (1954)
- Althausen Y. Neue einfache Methode zur quantitativen Zuckerbestimmung im Harn unter Anwendung der Reaktion von Moore und Heller. Sowjetruss.-ärztl. Z. 44, 786 (1940); Chem. Zbl. 1942 I, 394
- Armstrong E.F. and Hilditsch T.P. Conversion of the simple sugars into their enolic and ethylene oxide forms. J. Chem. Soc. London 115, 1410 (1919)
- Arnold C. und Behrens M. Die Reaktion auf Zuckerarten mit o-Nitrophenylpropionlsäure. Pharm. Zeitung 47, 459 (1902)
- Badische Anilin- u. Sodafabrik
- 1) Verfahren zur Erzeugung von violett-schwarzen Färbungen und Drucken auf der Faser. DRP. Nr. 79208 Kl. 22 (1894); Friedländer 4, 349 (1894/97)
 - 2) Verfahren zur Darstellung eines blauvioletten Farbstoffes aus α_1, α_4 -Dinitronaphthalin. DRP. Nr. 88 236 Kl. 22 (1896); Friedländer 4, 350 (1894/97)
- Baudisch O. and Deuel H.J. Studies on acetol I. A new test for carbohydrates. J. Americ. Chem. Soc. 44, 1585 (1922)
- Bayer A. Über die Verbindungen der Indigogruppe. Ber. Dtsch. Chem. Ges. 14, 1741 (1881)
- Becher E. und Herrmann E. Eine einfach und rasch ausführbare Methode zur Schätzung der Höhe des Blutzuckers. Münch. Med. Wschr. 71, 1464 (1924)
- Bendix E. und Schittenhelm A. Das Chromosaccharometer, ein neuer Apparat zur quantitativen Zuckerbestimmung im Urin. Münch. Med. Wschr. 53, 1309 (1906)

- Benedict S.R. 1) The detection and estimation of reducing sugars.
J. Biol. Chem. 3, 101 (1907)
- Benedict S.R. and Osterberg E. 2) A modification of the Lewis-Benedict method for the determination of sugar in the blood.
J. Biol. Chem. 34, 203 (1918)
- Benedict S.R. and Osterberg E. A method for the determination of sugar in normal urine.
J. Biol. Chem. 34, 195 (1918)
- Berg St.O. und Maier F. Zur Toxikologie einiger neuer Schädlingsbekämpfungsmittel.
Dtsch. Z. Gerichtl. Med. 40, 335 (1951)
- Berl W.G. and Feazel C.E. 1) The kinetics of hexose formation from trioses in alkaline solution.
J. Americ. Chem. Soc. 73, 2054 (1951)
- 2) Ultraviolett spectra of sugars in alkaline solution.
J. Agricult. a. Food Chem. 2, 37 (1954)
- Bernhauer K. und Görlich B. Die Umwandlungen des Methylglyoxals im alkalischen Medium.
Biochem. Z. 212, 452 (1929)
- Bernhauer K. und Wolf H. Die Spaltung der Glukose in C_3 -Ketten durch Erdalkalicarbonate.
Biochem. Z. 71, 144 (1915)
- Borel E. und Deuel H. Quantitative Zuckerbestimmung mit 3,4-Dinitrobenzoesäure.
Helv. Chim. Acta 36, 801 (1953)
- Borel E., Hostettler F. und Deuel H. Quantitative Zuckerbestimmung mit 3,5-Dinitrosalicylsäure-Phenol-Reagens nach Sumner.
Helv. Chim. Acta 35, 115 (1952)
- Bose P.K. Ein neuer, empfindlicher Nachweis reduzierender Kohlenhydrate.
Z. analyt. Chem. 87, 110 (1932)
- Brigl P. und Floetz Th. Flaschenträger-Lehnartz, Physiologische Chemie, Bd. I, 274
Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1951

de Bruyn L.C.A. et
van Ekenstein W.A.

- 1) Action des alcalis sur les sucres II.
Transformation réciproque des uns
dans les autres des sucres glucose,
fructose et mannose.
Rec. Trav. Chim. Pays-Bas 14,
203 (1895)
- 2) Action des alcalis sur les sucres III.
Transformation des sucres sous l'in-
fluence de l'hydroxyde de plomb.
Rec. Trav. Chim. Pays-Bas 15,
92 (1896)
- 3) Action des alcalis sur les sucres IV.
Remarques générales.
Rec. Trav. Chim. Pays-Bas 16,
257 (1897)
- 4) Action des alcalis sur les sucres VI.
La glutose et la pseudo-fructose.
Rec. Trav. Chim. Pays-Bas 16,
274 (1897)

Buchner E. und
Meisenheimer J.

Die chemischen Vorgänge bei der alko-
holischen Gärung.
Ber. Dtsch. Chem. Ges. 38, 620 (1905)

Buchner E.,
Meisenheimer J. und
Schade H.

Zur Vergärung des Zuckers ohne Enzyme.
Ber. Dtsch. Chem. Ges. 39, 4217 (1906)

Burger E.

Beiträge zum Nachweis von E 605.
Arch. Toxikologie 16, 401 (1957)

Chavassieu et
Morel

Über eine Farbenreaktion der reduzie-
renden Zucker, bewirkt durch m-Dini-
trobenzol in alkalischer Lösung.
Comptes Rendus de l'Acad. des Sciences
143, 966 (1906);
Chem. Zbl. 1907 I, 509

Creelius und
Seifert

Ein neues Blutzuckerkolorimeter nach
Creelius-Seifert.
Münch. Med. Wschr. 75, 1301 (1928)

Dakin H.D. and
Dudley H.W.

The interconversion of α -amino-acids,
 α -hydroxy-acids and α -ketonic aldehy-
des II.
J. Biol. Chem. 15, 127 (1913)

Demey-Ponsart E.,
Viviario R. et
Heusghem C.

L'intoxication par le parathion et sa
recherche toxicologique.
Arch. Belg. Méd. Soc. et Hyg. 13,
429 (1955)

- Denis W. Über das Verhalten verschiedener Aldehyde, Ketone und Alkohole gegen oxydierende Agenzien.
Am. Chem. J. 38, 561 (1907);
Chem. Zbl. 1908 I, 344
- Diggle W.M. and Gage J.C. 1) Cholinesterase inhibition in vitro by O,O-diethyl-O-p-nitrophenylthiophosphate (parathion).
Biochem. J. 49, 491 (1951)
2) Cholinesterase inhibition by parathion in vivo.
Nature (London) 168, 998 (1951)
- Dominikiewicz M. 2,7-Dioxy-3,6-Dinitrofluoran als Reagens für den Nachweis reduzierender Zucker.
Roczniki Chem. 12, 686 (1932);
Chem. Zbl. 1933 I, 939
- Doss K.S.G. and Ghosh S.K. Kinetics of color development in invert sugar solutions.
Proc. 17th Ann. Conv. Sugar Technol. Assoc. India, Pt. I., 26 (1948);
Sugar Ind. Abstr. 11, 47 (1949);
Chem. Abstr. 44, 5127 (1950)
- Duclaux E. Die Beziehungen zwischen dem Gärungsprozeß und dem Selbstverbrennungsprozeß im Sonnenlicht.
Wschr. f. Brauerei 10, 1329 (1893)
- Duspiva F. Zum Wirkungsmechanismus moderner synthetischer Insektizide.
Angewandte Chemie 66, 541 (1954)
- v. Eicken S. Zur Ausscheidung von p-Nitrophenol im Urin nach Einwirkung von Pflanzenschutzmittel E 605.
Angewandte Chemie 66, 551 (1954)
- Eisenbrand J. und v. Halban H. Über die Lichtabsorption der Nitrophenole.
Z. physik. Chem. (A) 146, 30, 101, 111 (1930)
- Esselborn W. Hoppe-Seyler-Thierfelder, Handbuch der physiologisch- und pathologisch-chemischen Analyse, Bd. I, 620
Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1953

v. Euler H. und
Eistert B.

Chemie und Biochemie der Reduktone und
Reduktonate.
Enke-Verlag, Stuttgart 1957

v. Euler H. und
Hasselquist H.

- 1) Oxydo-Reduktionsreaktionen an Endio-
len und an Tillmans-Reagens.
Arkiv för Kemi 1, Nr. 30, 257 (1949)
- 2) Reduktone.
Sammlung chemischer und chemisch-tech-
nischer Vorträge. Neue Folge H. 50,
Stuttgart 1950
- 3) Über eine Vorstufe des Triose-Re-
duktions bei der alkalischen Hexose-
Spaltung.
Liebig's Ann. Chem. 588, 205 (1954)
- 4) Zur Kinetik der Reduktone und Pseu-
doreduktone II.
Arkiv för Kemi 11, Nr. 43, 407 (1957)

v. Euler H.,
Hasselquist H. und
Ceder O.

- 1) Reduktone und Endiol-Umlagerungen in
saurer und alkalischer Lösung.
Liebig's Ann. Chem. 581, 198 (1953)
- 2) Struktur und Stabilität Schiff'scher
Basen und ihrer Vorstufen.
Arkiv för Kemi 6, Nr. 26, 287 (1953)

v. Euler H.,
Hasselquist H. und
Glaser A.

Aminoreduktone, Endiamine, Endithiole,
Enole und Redukton-Derivate.
Arkiv för Kemi 2, Nr. 30, 423 (1950)

v. Euler H.,
Hasselquist H. und
Hanshoff G.

- 1) Über die UV-Absorption in Lösungen
von Reduktonen I.
Z. f. Naturforschung 8b, 636 (1953)
- 2) Vorstufen der Reduktonbildung aus
Hexosen.
Arkiv för Kemi 6, Nr. 44, 471 (1954)

v. Euler H. und
Klußmann E.

Über Reduktion von Methylenblau durch
Produkte der alkalischen Zuckerspaltung.
Arkiv Kemi, Mineral., Geol. Ser. B. 11,
Nr. 13 (1933)

v. Euler H. und
Malm M.

Zur Kenntnis des Vitamin C und verwandter
Stoffe.
Arkiv Kemi Mineral., Geol. Ser. B. 11,
Nr. 9 (1933)

v. Euler H. und
Martius C.

Über Reduktion (Enol-Tartronaldehyd)
und Ascorbinsäure.
Liebig's Ann. Chem. 505, 73 (1933)

Evans W.L.

- 1) Der Mechanismus der Kohlenhydrat-
Oxydation.
Chem. Revs. 6, 281 (1929);
Chem. Zbl. 1930 I, 200
- 2) Some less familiar aspects of carbo-
hydrate chemistry.
Chem. Revs. 31, 537 (1942)

Evans W.K.,
Buehler C.A.,
Looker C.D.,
Crawford R.A. and
Holl C.W.

- 3) The mechanism of carbohydrate oxida-
tion I.
d-glucose, d-mannose, d-fructose, d-
and l-arabinose and d,l-glyceric al-
dehyde.
J. Americ. Chem. Soc. 47, 3085 (1925)

Evans W.L. and
Cornthwaite W.R.

- 4) The mechanism of carbohydrate oxida-
tion VII.
The action of potassium hydroxide on
dihydroxy-acetone.
J. Americ. Chem. Soc. 50, 486 (1928)

Evans W.L.
Edgar R.H. and
Hoff G.P.

- 5) The mechanism of carbohydrate oxida-
tion IV.
The action of potassium hydroxide on
d-glucose and d-galactose.
J. Americ. Chem. Soc. 48, 2665 (1926)

Evans W.L. and
Hass H.B.

- 6) The mechanism of carbohydrate oxida-
tion VI.
The action of potassium hydroxide on
d,l-glyceric aldehyde.
J. Americ. Chem. Soc. 48, 2703 (1926)

Evans W.L. and
Waring C.E.

- 7) The mechanism of carbohydrate oxida-
tion V.
The oxidation of dihydroxyacetone to
hydroxypyruvic aldehyde.
J. Americ. Chem. Soc. 48, 2678 (1926)

Farbwerke Hoechst

Verfahren zur Darstellung von Nitro- und
Amidoalizarinblau.
DRP Nr. 59190 Kl. 22, 1891; Friedländer
3, 249 (1890/94)

Fearon W.R. und
Kawerau E.

The oxidation of ascorbic acid by o-di-
nitrobenzene, and the detection of de-
hydroascorbic acid.
Biochem. J. 37, 326 (1943)

Feiertag G.

Untersuchungen zum Nachweis von E 605.
Inaugural-Dissertation, Erlangen 1957

Fernbach A. et
Schoen M.

Über einige Zersetzungsprodukte der
Glukose in alkalischer Flüssigkeit.
Comptes Rendus de l'Acad. des Sciences
158, 976 (1914);
Chem. Zbl. 1914 I, 1820

Fieser L.F. und
Fieser M.

Lehrbuch der organischen Chemie.
Übersetzt und bearbeitet von H.R. Hen-
sel.
Verl. Chemie GmbH Weinheim/Bergstr.
1954

Fischer H.O.L. und
Baer E.

Synthese von d-Fructose und d-Sorbose
aus d-Glyzerinaldehyd bzw. aus d-Glyze-
rinaldehyd und Dioxyceton.
Helv. Chim. Acta 19, 519 (1936)

Fischler F.

- 1) Beiträge zur Frage der Zuckerwirkung
im Organismus I.
Über die Zuckerspaltung unter der
Wirkung stark verdünnten Alkalis.
Z. physiolog. Chem. 157, 1 (1926)
- 2) Beiträge zur Frage der Zuckerwirkung
im Organismus II.
Zersetzung des Traubenzuckers durch
stark verdünntes Alkali.
Z. physiolog. Chem. 165, 53 (1927)

Fischler F.,
Hauss H. und
Täufel K.

Chemische und physikalisch-chemische
Studien über Methylglyoxal und dessen
Beziehungen zur alkalischen Trauben-
zuckerspaltung.
Biochem. Z. 227, 156 (1930)

Fischler F. und
Reil J.

Weitere Beiträge zur Kenntnis des Zuk-
kerabbaus im alkalischen Medium, sowie
unter gleichzeitiger Einwirkung von
Oxydationsmitteln.
Biochem. Z. 227, 140 (1930)

Fischler F.,
Täufel K. und
Souci S.W.

Über das Verhalten des Traubenzuckers
beim Erhitzen in alkalischer Lösung.
Biochem. Z. 208, 191 (1929)

Framm F.

Über die Zersetzung von Monosacchariden
durch Alkalien.
Pflüger's Arch. ges. Physiol. 64, 575
(1896)

Gabryelski W. und
Marchlewski L.

- 1) Zur Kenntnis reduzierender Zucker I.
Biochem. Z. 250, 385 (1932)
- 2) Zur Kenntnis reduzierender Zucker II.
Biochem. Z. 261, 393 (1933)

- Gage J.C. Determination of p-nitrophenol and p-nitrophenyl-O,S-diethylthiophosphate in parathion.
Analyst (London) 77, 123 (1952)
- Gardner L.I.,
Berman H.,
McLachlan E. and
Terry M.L. Quantitative spinal fluid glucose micro method for the pediatric ward laboratory.
J. Laborat. a. Clinical Med. 34, 725 (1949)
- Giannettasio G. Photometric determination of glycosuria.
Laboratorio (Granada, Span.) 7, 515 (1952);
Chem. Abstr. 47, 9392 (1953)
- Groot J. Über die Vergärung des Zuckers ohne Enzyme.
Z. physik. Chem. 57, 1 (1907)
- Guillaume-Gentil B. Nachweis des Traubenzuckers im Harn.
Schweiz. Wschr. Pharm. 31, 225, 237 (1893);
Chem. Zbl. 1893 II, 338
- Hallmann L. Klinische Chemie und Mikroskopie, 458
Thieme-Verlag, Stuttgart 1950
- Hiller A. A quantitative test for small amounts of sugar in the urine.
J. Biol. Chem. 30, 125 (1917)
- Hinsberg K. Hoppe-Seyler/Thierfelder, Handbuch der physiologisch- und pathologisch-chemischen Analyse, Bd. V, 22
Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1953
- Honig P. The chemistry of the carbonation process applied to raw sugar liquors.
Sugar 46, Nr. 4, 37 (1951)
- Hoppe-Seyler F. 1) Zit. nach Jolles (1)
2) Über die Bildung von Milchsäure aus Zucker ohne Gärung.
Ber. Dtsch. Chem. Ges. 4, 346 (1871)
- Hostettler E.,
Borel E. und
Deuel H. Über die Reduktion der 3,5-Dinitrosalicylsäure durch Zucker.
Helv. Chim. Acta 34, 2132 (1951)

- Hough L.,
Jones J.K.N. and
Richards E.L. The reaction of amino-compounds with
sugars II. The action of ammonia on
glucose, maltose and lactose.
J. Chem. Soc. London 1953, 2005
- Isbell H.S. Interpretation of some reactions in the
carbohydrate field in terms of the con-
secutive electron displacement.
J. Research Natl. Bur. Standards 32,
45 (1944). (Research Paper No 1573)
- Jansen R. Über die technische Darstellung von
p-Diaminoazoxytoluol.
Z. Farbenindustrie 12, 181 (1913)
- Jolles A. 1) Erfahrungen über den Wert der meist-
gebrauchten Proben für den Nachweis
von Zucker im Harn.
Zbl. innere Med. 15, 1025 u. 1049
(1894)
- 2) Über eine neue Methode zur quantita-
tiven Bestimmung der Saccharose neben
anderen Zuckerarten.
Z. Unters. Nahrungs- u. Genußmittel
20, 631 (1910)
- 3) Zur Kenntnis des Zerfalls der Zucker-
arten.
Biochem. Z. 29, 152 (1910)
- 4) Einwirkung von Ammoniak und von Na-
triumcarbonat auf verschiedene Zucker-
arten in verdünnter wäßriger Lösung.
Biochem. Z. 32, 97 (1911)
- 5) Über eine neue Methode zur quantita-
tiven Bestimmung der Saccharose ne-
ben anderen Zuckerarten.
Monatshefte f. Chemie 32, 1 (1911)
- Kaiser H. und
Haag Th. Zum chemisch-toxikologischen Nachweis
von E 605 "Bayer" sowie einiger anderer
Insektizide der Thiophosphorsäure-Reihe.
Archiv der Pharmazie 289/69, 542 (1956)
- Kaufmann E. 1) Diabetes und Insulinbehandlung in
der Praxis.
Münch. Med. Wschr. 72, 1681 (1925)
- 2) Ein Doppelkeilkolorimeter zur Blut-
zuckerbestimmung.
Münch. Med. Wschr. 72, 1685 (1925)
- 3) Modifikation und Verfeinerung der
Mikro-Blutzuckerbestimmung nach Becher
und Herrmann.
Münch. Med. Wschr. 73, 771 (1926)

- Ketelaar J.A.A. and
Hellingman J.E. Chemical studies on insecticides - deter-
mination of parathion and dimethylpara-
thion.
Analyt. Chem. 23, 646 (1951)
- Kilian H. Über Saccharinsäuren.
Ber. Dtsch. Chem. Ges. 41, 158 (1908)
- Knoop F. und
Windaus A. Verfahren zur Darstellung von d-Methyl-
imidazol.
DRP Nr. 183588 Kl. 12 p (1905);
Chem. Zbl. 1907 I, 1648
- Kolthoff I.M. La sensibilité d'indicateurs colorants
à des températures plus élevés que la
température ordinaire.
Rec. Trav. Chim. Pays-Bas 40, 784 (1921)
- Kolthoff I.M. and
van der Goot E. The adsorption of hydroxybenzenes and
other aromatic compounds and their re-
placing action upon each other at the
interface water-charcoal.
Rec. Trav. Chim. Pays-Bas 48, 277 (1929)
- Kortüm G. 1) Über die Zuordnung von Elektronen-
banden in Lösungsspektren.
Z. physik. Chem. (B) 42, 39 (1939)
2) Kolorimetrie und Spektralphotometrie
Bd. II, 2, 14, 177 (1942)
- Kröner W. and
Kothe H. Discoloration of dextrose solutions.
Industr. a. Engng. Chem. 31, 248 (1939)
- Kuhn H. Lichtabsorption organischer Farbstoffe.
Chimia 4, 203 (1950)
- Kuhn R. und
Wagner-Jauregg Th. Geschwindigkeit der Oxydation von Zuk-
kern durch Permanganat.
Ber. Dtsch. Chem. Ges. 58, 1441 (1925)
- Kuhn R. und
Weygand F. o- und p-Nitrophenylhydroxylamin.
Ber. Dtsch. Chem. Ges. 69, 1969 (1936)
- Laurent T.C. and
Wertheim E.M. Effect of ultraviolet light on absorp-
tion spectra of carbohydrates.
Acta Chem. Scandinavica 6, 678 (1952)
- Lei Paredes C. Escarza's method for determination of
small quantities of glucose in the
blood.
Farm. nueva (Madrid) 14, 393 (1949);
Chem. Abstr. 44, 4538 (1950)
- Lendle L. Zu den E 605-Vergiftungen.
Dtsch. Med. Wschr. 79, 725 (1954)

- Lewis R.C. and Benedict S.R. A method for the estimation of sugar in small quantities of blood. J. Biol. Chem. 20, 61 (1915)
- Liggett R.W. and Deitz V.R. Color and turbidity of sugar products. Advan. in Carbohydr. Chem. 9, 247 (1954) zit. nach Liggett und Deitz.
- Liggett R.W. and Devlin J.A. Abstracts Papers Americ. Chem. Soc. 119, 11 Q (1952)
- Löb W. Beiträge zur Frage der Glykolyse II. Die Bedeutung der Phosphate für die oxydative Glykolyse. Biochem. Z. 32, 43 (1911)
- Lowitz T. Einige neuere Bemerkungen über die Natur des Honigs und die Darstellung seines zuckerartigen Bestandteiles in trockener Gestalt. Chem. Ann. v. Crell 1, 445 (1792)
- Malyoth G. und Stein H.W. Zur alkalischen Umlagerung der Zucker. Angewandte Chemie 64, 399 (1952)
- Mayer P. Über Zerstörung von Traubenzucker durch Licht. Biochem. Z. 32, 1 (1911)
- Meisenheimer J. Über das Verhalten der Glukose, Laevulose und Galaktose gegen verdünnte Natronlauge. Ber. Dtsch. Chem. Ges. 41, 1009 (1908)
- Metcalf R.L. and March R.B. Further studies on the mode of action of organic thionophosphate insecticides. Ann. Entomol. Soc. Amer. 46, 63 (1953)
- Montgomery R. 1) Chemical production of lactic acid from sugars. Sugar Research Foundation N.Y., Research Rept. Ser. 11, 28 (1949)
2) Chemical production of lactic acid and other acids from molasses - alkaline degradation of sugars. Industr. a. Engng. Chem. 45, 1144 (1953)
- Moore und Heller Zit. nach Althausen und nach Guillaume-Gentil.
- Mühlmann R. und Schrader G. Hydrolyse der insektiziden Phosphorsäureester. Z. f. Naturforschung 12 b, 196 (1957)

- Murschhauser H.
- 1) Über die Einwirkung von Carbonaten der alkalischen Erden auf Traubenzucker I. Traubenzucker und Calciumcarbonat. Biochem. Z. 97, 97 (1919)
 - 2) Über die Einwirkung von Carbonaten der alkalischen Erden auf Traubenzucker II. Traubenzucker und reinstes Calciumcarbonat. Biochem. Z. 99, 190 (1919)
 - 3) Über die Einwirkung von Carbonaten der alkalischen Erden auf Zucker III. Biochem. Z. 101, 74 (1919)
- Myers V.C. and Bailey C.V.
- The Lewis and Benedict method for the estimation of blood sugar, with some observations obtained in disease. J. Biol. Chem. 24, 147 (1916)
- Nef J.U.
- 1) Dissoziationsvorgänge in der Glykol-Glycerinreihe. Liebig's Ann. Chem. 335, 191 (1904)
 - 2) Dissoziationsvorgänge in der Zuckergruppe I. Über das Verhalten der Zuckerarten gegen Fehling'sche Lösung und andere Oxydationsmittel. Liebig's Ann. Chem. 357, 214 (1907)
 - 3) Dissoziationsvorgänge in der Zuckergruppe II. Über das Verhalten der Zuckerarten gegen Ätzalkalien. Liebig's Ann. Chem. 376, 1 (1910)
 - 4) Dissoziationsvorgänge in der Zuckergruppe III. Liebig's Ann. Chem. 403, 204 (1914)
- Nelson E.K. and Browne C.A.
- The properties and chemical constitution of glucic acid. J. Americ. Chem. Soc. 51, 830 (1929)
- Neuberg C. und Oertel W.
- Studien über Methylglyoxalbildung. Biochem. Z. 55, 495 (1913)
- Neuberg C. und Rewald B.
- Studien über Methylglyoxalbildung. Biochem. Z. 71, 144 (1915)
- Nodzu R. und Goto R.
- Die Einwirkung schwacher Alkalien auf Glukose. Bull. Chem. Soc. Japan 11, 381 (1936); Chem. Zbl. 1937 I, 1154
- Norrish R.G.W. and Griffiths J.G.A.
- The photochemical decomposition of glyoxal. J. Chem. Soc. London 1928, 2829

- Pearce R.C. A criticism of the Bang and Lewis-Benedict methods for the estimation of blood sugar, with suggestions for a modification of the latter method.
J. Biol. Chem. 22, 525 (1915)
- Péronnet M. et Hugonnet J. Neue colorimetrische Methode zur Bestimmung von Glukose in biologischen Flüssigkeiten.
Ann. pharm. franc. 9, 397 (1951);
Chem. Zbl. 1954, 7480
- Pestemer M. und Scheibe G. Über die einheitliche Darstellung der Lichtabsorption von Lösungen im Sichtbaren und im Ultraviolett.
Angewandte Chemie 66, 553 (1954)
- Petuely F. und Meixner UV-spektroskopische Untersuchungen an Zuckern. Die Einwirkung von NaOH auf Glukose; der Nachweis der Endiolatform der Glukose.
Chem. Ber. 86, 1255 (1953)
- Peyer W. Über einige seltenere Harnreaktionen.
Pharmaz. Zentralhalle 86, 161 (1947)
- Pigman W.W. and Goepp R.M. jr. Chemistry of the carbohydrates.
Academic Press Inc., Publishers,
New York, N. Y. 1948
- Ploetz Th. Hoppe-Seyler/Thierfelder, Handbuch der physiologisch- und pathologisch-chemischen Analyse, Bd. III, 1. Teil, 684
Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1955
- Poe C.F. and Edson F.C. Bestimmung des reduzierenden Zuckers in Nahrungsmitteln. Vorschlag einer colorimetrischen Methode.
Industr. Engng. Chem. Analyt. Ed. 4, 300 (1932);
Chem. Zbl. 1932 II, 3172
- Post H. Über Fehlerquellen bei der spektrophotometrischen Analyse zur Identifizierung von E 605.
Inaugural-Dissertation, Erlangen 1957
- Powell C.W.R. The action of alkalis on dextrose and laevulose.
J. Chem. Soc. London 107, 1335 (1915)
- Power M.H. und Upson F.W. The oxidation of d-glucose by air in calcium hydroxide solution.
J. Americ. Chem. Soc. 48, 195 (1926)

- Pribilla O. Vergiftungen mit E 605 (O,O-Diaethyl-O,p-Nitrophenyl-Thiophosphorsäure-ester).
Arch. Toxikologie 15, 210 (1954)
- Quirini Ein verlässliches Reagens auf Zucker im Harn.
Pharm. Post 27, 54 (1894);
Vierteljschr. Fortschr. Chem. d. Nahrungs- u. Genußmittel. 9, 59 (1894);
Chem. Zbl. 1894 II, 453
- Robinson D.,
Smith J.N. and
Williams R.T. Studies in detoxication.
Biochem. J. 50, 221 (1951)
- Rudeck E. Kolorimetrische Harnzuckerbestimmung.
Pharm. Zeitg. 49, 653 (1904);
Chem. Zbl. 1904 II, 673
- Ruini G. Über den Nachweis und die klinische Bestimmung der Glukose im Urin mittels o-Nitrophenylpropionlsäure.
Boll. Chim. Farm. 40, 753 (1901);
Chem. Zbl. 1902 I, 72
- Sattler L. and
Zerban F.W. Unfermentable reducing substances in molasses - volatile decomposition products of sugars and their role in melanoidin formation.
Industr. a. Engng. Chem. 41, 1401 (1949)
- Schachkeldian A. Eine neue Methode zur colorimetrischen Bestimmung der α -Glukose.
Journ. Russ. phys.-chem. Ges. 60, 1517 (1928);
Chem. Zbl. 1929 I, 2907
- Schade H. Über die Vergärung des Zuckers ohne Enzyme.
Z. physik. Chem. 57, 1 (1907)
- Scharwin W. Über die Farbe von Lösungen der Nitrophenole.
J. Russ. Phys. Chem. Ges. 42, 237;
Chem. Zbl. 1910 I, 1706, 2084
- Scheibler C. 1) Über das Saccharin und die Saccharinsäure.
Ber. Dtsch. Chem. Ges. 13, 2212 (1880)
2) Beitrag zur Bildung des Saccharins aus den Glykosen.
Neue Z. Rübenzuckerind. 11, 130 (1883)

- Schiff H. Untersuchungen über Salicinderivate.
Ann. d. Chemie u. Pharmacie 154, 1
(1870)
- Schilow N. und
Nekrassow B. Adsorption und chemische Natur einiger
organischer Verbindungen.
Z. physik. Chem. 130, 65 (1927)
- Schmidt Gg. Toxikologische Erfahrungen bei E 605-
Vergiftungen.
Archiv Toxikologie 15, 361 (1955)
- Schmidt O. Die inneren Energieverhältnisse organi-
scher Substanzen III. Die experimentel-
len Unterlagen der Doppelbindungsregel.
Die Zuckerspaltung.
Ber. Dtsch. Chem. Ges. 68, 60 (1935)
- Schmitz E. Über den Mechanismus der Acrose-Bildung.
Ber. Dtsch. Chem. Ges. 46, 2327 (1913)
- Scholl R. und
Eberle F. Einige Betrachtungen über den Verlauf
der Indanthrenschmelze des 2-Amino-
anthrachinons und Versuche über 2-Hy-
droxylamino-2,2'-Azoxyanthrachinon.
Monatshefte Chemie 32, 1035 (1911)
- Schrader G. Die Entwicklung neuer Insektizide auf
der Grundlage organischer Fluor- und
Phosphorverbindungen.
Monographie Nr. 62, Verlag Chemie GmbH,
Weinheim/Bergstraße 1952
- Schwerd W. und
Schmidt Gg. Einfache Schnellreaktion im Blut zum
Nachweis von Vergiftungen mit dem
Schädlingsbekämpfungsmittel E 605.
Dtsch. Med. Wschr. 77, 372 (1952)
- Shaffer P.A. and
Friedemann T.E. Sugar activation by alkali I.
Formation of lactic and saccharinic
acids.
J. Biol. Chem. 86, 345 (1930)
- Shou S.A. und
Wurmser R. zit. nach Fischler, Hauss u. Täufel
- Speck J.S. zit. nach Liggett u. Deitz
- Spoehr H.A. and
Strain H.H. 1) The interconversion of hexoses by
means of phosphates and the forma-
tion of glutose.
J. Biol. Chem. 85, 365 (1929)
2) The effect of weak alkalies on the
trioses and on methylglyoxal.
J. Biol. Chem. 89, 503 (1930)

- 3) Über die angebliche Polysaccharid-
bildung in alkalischen Lösungen von
Hexosen.
Biochem. Z. 264, 1 (1933)
- Stöhr R. und
Scheibl F. Colorimetrische Bestimmung der Pikrin-
säure in Pikraten organischer Basen.
Mikroch. verein. Mikrochim. Acta 36/37,
362 (1951)
- Sumner J.B. A more specific reagent for the de-
termination of sugar in urine.
J. Biol. Chem. 65, 393 (1925)
- Sumner J.B. and
Graham A. 1) Dinitrosalicylic acid: A reagent
for the estimation of sugar in normal
and diabetic urine.
J. Biol. Chem. 47, 5 (1921)
- 2) Dinitrosalicylsäure als Blutzucker-
reagens.
Proc. of the Soc. Exp. Biol. a.
Med. 20, 96 (1922);
Ber. ges. Physiol. 18, 231 (1923)
- Sumner J.B. and
Noback C.V. The estimation of sugar in diabetic
urine, using dinitrosalicylic acid.
J. Biol. Chem. 62, 287 (1924)
- Thomas W. and
Dutcher R.A. The colorimetric determination of car-
bohydrates in plants by the picric acid
reduction method I. The estimation of
reducing sugars and sucrose.
J. Americ. Chem. Soc. 46, 1662 (1924)
- Thornton B.J. and
Speck J.C. jr. Fluorometric determination of pyruval-
dehyde.
Anal. Chem. 22, 899 (1950)
- Watson W.R.,
Mukerje K.C.,
Gupta D.N. und
Chaturvedi H.S. Über die Gewinnung von Saccharose aus
Rohrzuckermelassen.
Quarterly J. Indian Chem. Soc. 3, 229
(1926);
Chem. Zbl. 1927 I, 957
- Weinig E. 1) Diskussionsbeitrag auf dem Kongreß
der Dtsch. Ges. f. gerichtl. u.
soz. Med., Marburg/Lahn, 1.-3.
Oktober 1956
Dtsch. Z. Gerichtl. Med. 46, 269
(1957)
- 2) Die Nachweisbarkeit von Giften in
exhumierten Leichen.
Dtsch. Z. Gerichtl. Med. 1958
(im Druck)

- Weygand F. Papierchromatographische Untersuchung
der Reduktonbildung.
Arkiv för Kemi 3, Nr. 2, 11 (1951)
- Weygand F. und
Hofmann H. Polleninhaltsstoffe I. Zucker, Folin-
säure und Ascorbinsäure.
Chem. Ber. 83, 405 (1950)
- Willaman J.J. and
Davison F.R. Einige Abänderungen der Pikrinsäureme-
thode für Zucker.
J. Agricult. Research 28, 479 (1924);
Chem. Zbl. 1925 I, 1463
- Windaus A. und
Knoop F. Überführung von Traubenzucker in Methyl-
imidazol.
Ber. Dtsch. Chem. Ges. 38, 1166 (1905)
- Windisch W.,
Kolbach P. und
Ruckdeschel H. Über die Bildung von Milchsäure aus
Zucker durch Einwirkung von Alkalien.
Wschr. f. Brauerei 44, 405, 417, 429,
441 (1927)
- Wirth W. Zur Pharmakologie der insektiziden
Phosphorsäureester.
Dtsch. Med. Wschr. 79, 1205 (1954)
- Wohl A. und
Neuberg C. Zur Kenntnis des Glyzerinaldehyds.
Ber. Dtsch. Chem. Ges. 33, 3095 (1900)
- Zerban F.W. The color problem in sucrose manufac-
ture.
Technolog. Rept. Ser. 2, Sugar Res.
Found., Inc., New York, N. Y. 1947

Herr Professor Dr. Dr. E. WEINIG hat mir für die vorliegende Dissertation das Thema überlassen und mich während der Arbeit in jeder Weise unterstützt und betreut. Dafür danke ich ihm von ganzem Herzen.

Herzlich danke ich auch Herrn Privatdozent Dr. W. SCHWERT für manchen guten Rat und für seine fördernde Kritik.

Lebenslauf

Am 24. April 1929 wurde ich, Renate Prechtel, als Tochter des Oberingenieurs Dipl.-Ing. Ludwig Prechtel (†) und seiner Ehefrau Emma, geb. Treuheit (†) zu Nürnberg geboren.

Nach 4 Klassen Volksschule trat ich in Nürnberg 1939 in die Städtische Oberrealschule für Mädchen ein, wo ich im Sommer 1948 die Reifeprüfung bestand. Dem Studium der Medizin widmete ich mich vom SS 1949 bis zum SS 1950 und vom SS 1952 bis zum WS 1955/56 an den Universitäten Erlangen, Tübingen, Heidelberg und München. Die ärztliche Vorprüfung legte ich im April 1953 an der Universität Erlangen, das Medizinische Staatsexamen im Sommer 1956 an der Universität München ab.

Von Januar bis Oktober 1957 war ich an der I. Medizinischen Klinik des Städtischen Krankenhauses Nürnberg als Medizinalassistentin tätig. Von November 1957 bis Juni 1958 arbeitete ich am Institut für Gerichtliche Medizin und Kriminalistik der Universität Erlangen an meiner Dissertation.

